



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA



**Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”**

**CLARIANA ZANUTTO PAULINO DA CRUZ**

**IMOBILIZAÇÃO DE ALCALASE® EM PÓ DE SABUGO DE MILHO:  
HIDRÓLISE DAS PROTEÍNAS DO SORO DE QUEIJO BOVINO E  
OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS**

ARARAQUARA-SP  
2017

**CLARIANA ZANUTTO PAULINO DA CRUZ**

**IMOBILIZAÇÃO DE ALCALASE® EM PÓ DE SABUGO DE MILHO: HIDRÓLISE  
DAS PROTEÍNAS DO SORO DE QUEIJO BOVINO E OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS  
BIOATIVOS**

Tese apresentada ao Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Araraquara, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.  
Orientador: **Prof. Dr. Rubens Monti.**

ARARAQUARA-SP  
2017

FICHA CATALOGRÁFICA

C955i Cruz, Clariana Zanutto Paulino da  
Imobilização de alcalase em pó de sabugo de milho:hidrólise das proteínas do soro do queijo bovino e obtenção de peptídeos bioativos / Clariana Zanutto Paulino da Cruz. – Araraquara : [s.n.], 2017  
104 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química  
Orientador: Rubens Monti  
Coorientador: Saulo Santesso Garrido

1. Enzimas proteolíticas. 2. Hidrolisados de proteína.  
3. Peptídeos. 4. Resíduos agrícolas. 5. Soro do leite. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

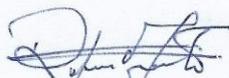
TÍTULO DA TESE: "Imobilização de alcalase em pó de sabugo de milho: hidrólise das proteínas do soro de queijo bovino e obtenção de peptídeos bioativos"

**AUTORA: CLARIANA ZANUTTO PAULINO DA CRUZ**

**ORIENTADOR: RUBENS MONTI**

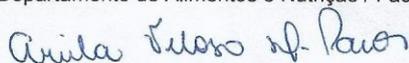
**COORIENTADOR: SAULO SANTESSO GARRIDO**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. RUBENS MONTI

Departamento de Alimentos e Nutrição / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara



Prof. Dr.ª ARIELA VELOSO DE PAULA

Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara



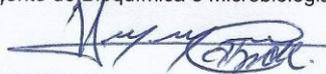
Prof. Dr. FERNANDO MASARIN

Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. JONAS CONTIERO

Departamento de Bioquímica e Microbiologia / Instituto de Biociências - UNESP - Rio Claro



Prof. Dr. HAMILTON CABRAL

Departamento de Ciências Farmacêuticas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP - Ribeirão Preto

Araraquara, 21 de dezembro de 2017



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA



**Dados curriculares**

**CLARIANA ZANUTTO PAULINO DA CRUZ**

**Formação acadêmica/titulação**

**2014 – 2017**

Doutorado em Biotecnologia (Conceito CAPES 6).

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

Título: Imobilização de alcalase® em pó de sabugo de milho: hidrólise das proteínas do soro de queijo bovino e obtenção de peptídeos bioativos

Bolsista: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.

Orientador: Prof. Dr. Rubens Monti.

**2017 – 2017**

Doutorado Sanduíche (PDSE).

Università degli Studi di Pavia, UNIPV, Itália.

Período: Março de 2017 à Agosto de 2017 (6 meses).

Título: Purificação parcial e caracterização de peptídeos bioativos derivados da hidrólise de proteínas do soro de queijo utilizando alcalase® imobilizada em suporte inovativo de baixo custo.

Bolsista: Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE) – CAPES, Itália.

Orientadora: Profa. Dra. Gabriella Massolini.

**2004 – 2006**

Mestrado em Ciência Animal (Conceito CAPES 5).

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

Título: Produção de biomassa por *Rubrivivax gelatinosus* em efluente de abatedouro avícola utilizando métodos industriais.

Ano de Obtenção: 2006.

Bolsista: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.

Orientadora: Profa. Dra. Elisa Helena Giglio Ponsano.

**1999 – 2004**

Bacharelado em Química.

Universidade Estadual de Londrina, UEL, Brasil.

Título: Ensaio de toxicidade pela inibição da respiração microbiana através de *E. coli* em Fia-condutométrico.

Ano de obtenção: 2004.

Bolsista: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Josefa Santos Yabe.

## **Atuação profissional**

### **2010 – 2017**

Professora de ensino superior.

Universidade Paulista, UNIP, Unip de Araçatuba-SP e Unip de Araraquara-SP.

Disciplinas ministradas: Química Geral, Métodos Instrumentais de Análises, Bioquímica Estrutural, Bioquímica Metabólica, Química Aplicada, Química Geral, Química Analítica.

Cursos: Farmácia, Fisioterapia, Enfermagem, Nutrição, Biomedicina, Ciências Biológicas, Engenharia Civil, Engenharia de Produção e Engenharia Mecânica.

### **2011 – 2011**

Professora de ensino superior.

Centro Universitário Toledo Araçatuba, UNITOLEDO, Araçatuba-SP.

Universidade Paulista, UNIP, Unip de Araçatuba-SP.

Disciplinas ministradas: Química Geral, Química Analítica e Bromatologia.

Cursos: Engenharia Civil, Engenharia Mecânica, Engenharia Elétrica e Nutrição.

### **2010 – 2013**

Professora dos cursos técnicos: Técnico em Análise e Produção de Açúcar e Álcool e Técnico em Química.

Professora do Ensino médio.

Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza, Etec de Araçatuba-SP, ETEC, Brasil.

Disciplinas ministradas: Química, Logística Sucroalcooleira I, Logística Sucroalcooleira II, Tecnologia de Subprodutos, TCC, Boas Práticas de Laboratório, Química dos Polímeros, Processos Eletroquímicos-Corrosão, Planejamento do trabalho de conclusão de curso (TCC) para o curso de Química. Química Analítica.

### **2006 – 2009**

Professora do ensino médio e fundamental II.

Colégio Uniesp de Birigui, UNIESP, Birigui-SP.

Disciplinas ministradas: Química, Física e Ciências.

## **Artigos completos publicados em periódicos**

### **2016**

Bassan, J. C., de Souza Bezerra, T. M., Peixoto, G., da Cruz, C. Z. P., Galán, J. P. M., Vaz, A. B. D. S., & Monti, R. (2016). Immobilization of Trypsin in Lignocellulosic Waste Material to Produce Peptides with Bioactive Potential from Whey Protein. *Materials*, 9(5), 357.

### **2008**

Ponsano, E. H., Paulino, C. Z., & Pinto, M. F. (2008). Phototrophic growth of *Rubrivivax gelatinosus* in poultry slaughterhouse wastewater. *Bioresource technology*, 99(9), 3836-3842.

### **Principais trabalhos/seminários apresentados**

- *Apresentação oral de trabalho científico*. Evento: YISAC 2017. 28-30 de junho de 2017, Veneza, Itália. Local: University Ca'Foscari of Venice. Título: Production and characterization of whey peptides bioactive in a packed bed reactor (PBR).

- *Apresentação de Seminário*. Università di Roma, "LA SAPIENZA", Dipartimento di Chimica, Roma, Itália, 18 de julho de 2017. Título: Production and characterization of whey peptides bioactive in a packed bed reactor (PBR).

- *Apresentação de Seminário Geral*. Instituto de Química-Unesp de Araraquara. 10 de Novembro de 2017. Título: Imobilização da alcalase® em pó de sabugo de milho e aplicação para hidrólise de soroproteínas do queijo: obtenção de peptídeos multifuncionais.

- *Apresentação oral de trabalho científico*. Evento: Enzitec. Caxias do Sul-RS, 17 a 20 de julho de 2016. Título: Hidrólise das proteínas do soro de queijo utilizando a alcalase® imobilizada em pó de sabugo de milho.

- *Apresentação de trabalho (resumo) na forma de pôster*. Congresso Farmacêutico da Unesp. VI Congresso Científico da Unesp e II Jornada de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Araraquara-SP, 15 à 19 de Agosto de 2016. Título: Peptídeos lácteos multifuncionais obtidos com alcalase® imobilizada em resíduo lignocelulósico.

- *Apresentação de trabalho completo na forma de pôster*. Evento: XX SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS XI SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS. Fortaleza-CE, 01 à 04 de Setembro de 2015. Título: Hidrólise enzimática de proteínas lácteas para obtenção de peptídeos bioativos utilizando alcalase® comercial.

- *Apresentação de trabalho completo na forma de pôster*. Evento: XX SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS XI SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS. Fortaleza-CE, 01 à 04 de Setembro de 2015. Título: Produção de biomassa pelo fungo *Aspergillus nidulans* (mutante mel1) utilizando vinhaça como substrato.

- *Apresentação oral de trabalho científico*. Evento: Simpósio Latino Americano de Ciências de Alimentos, 11 SLACA. Campinas-SP, Brasil, 8 à 11 de Novembro de 2015. Título: Production of bioactives peptides derived from milk proteins in a packed bed reactor with derivative alcalase® corn cob powder glyoxyl.

- *Apresentação de trabalho (resumo) na forma de pôster*. Evento: Simpósio Latino Americano de Ciências de Alimentos, 11 SLACA. Campinas-SP, Brasil, 8 à 11 de Novembro de 2015. Título: Imobilização da alcalase® em suporte inovativo pó de sabugo de milho glioxil.

### **Estágio-docência**

Local: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara.

Curso: Farmácia-Bioquímica.

Disciplina: Enzimologia Farmacêutica.

Docente responsável: Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti e Prof. Dr. Rubens Monti.

### **Aulas ministradas durante o doutorado**

- a) “Enzimas proteolíticas” para os alunos do 4º ano integral (8º semestre) do curso de Farmácia-Bioquímica.
- b) “Preparação e ativação de suportes inovativos de baixo custo” para os alunos de pós-graduação em Alimentos e Nutrição.

### **Participação em banca examinadora**

- a) Participou da banca examinadora do Trabalho de Conclusão do Curso de Farmácia-Bioquímica, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da UNESP, do trabalho intitulado “Obtenção e produção de enzima proteolítica a partir de fungo filamentosos inoculado em meio de cultivo líquido”, de autoria da acadêmica Debora Bernardes Francisco, no dia 14 de dezembro de 2015.

### **Curso de curta duração ministrado**

Ministrou o curso: “Aspectos Teóricos e Práticos sobre Bromatologia”. X Semana da Química, Faculdade de Ciências da UNESP, Bauru-SP, de 03 à 07 de outubro de 2016, com carga horária de 08 (oito) horas.

## DEDICATÓRIA

*Ao meu querido esposo Cleber,*

pessoa com quem amo partilhar a vida. Com você tenho me sentido mais forte. Obrigada pelo apoio, amizade, carinho, compreensão, sacrifício, paciência e por sua capacidade de me trazer paz em situações circunstanciais.

*Aos meus amados pais Celso e Clotilde,*

que sempre primaram pela minha educação. Obrigada por terem me ensinado os valores mais preciosos deste mundo: honestidade, humildade, simplicidade e bondade. Agradeço imensamente por terem me tornado uma pessoa corajosa e batalhadora. Com vocês aprendi que nada nesta vida conquistamos sem sacrifício e que vale muito a pena lutar pelos nossos sonhos. Vocês sempre serão o meu porto seguro.

*À minha querida irmã caçula Renata,*

por ser minha melhor amiga. Obrigada pelo incentivo, carinho e apoio. Sua presença significou segurança e certeza de que eu não estava sozinha nessa caminhada.

*Dedico este trabalho a minha família, sem vocês eu nada seria!*

## AGRADECIMENTOS

À Deus por ouvir minhas orações e permitir que eu realizasse o sonho do doutorado. “Deleite-se no Senhor, e ele atenderá aos desejos do seu coração” (Salmos 37:4). Por me fortalecer todas as vezes que eu precisei. “Deus é o que me cinge de força e aperfeiçoa o meu caminho” (Salmos 18:32). Agradeço a Ele também por colocar pessoas fundamentais em minha vida que me ajudaram a trilhar este percurso. “O Eterno traça o caminho que você escolhe” (Salmos 1:6).

À minha família, pais Celso e Clotilde, irmã Renata, cunhado João e marido Cleber pelo apoio, compreensão, paciência, incentivo e amor incondicional. Muito obrigada! Sem vocês eu não teria conseguido.

Ao meu orientador Prof. Dr. Rubens Monti a quem tenho profunda admiração e respeito por sua sabedoria, conhecimento, humildade e maneira de ensinar. Obrigada pela confiança, apoio e instruções oferecidas durante toda esta caminhada.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Saulo Santesso Garrido pela prontidão em me ajudar tecnicamente e pessoalmente sempre que precisei. Muito obrigada pelo seu cuidado e atenção! Agradeço também por colocar o seu laboratório (Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química do Instituto de Química de Araraquara) à minha disposição para a realização dos ensaios microbiológicos e fracionamento dos peptídeos por RP-HPLC.

À minha orientadora italiana Profa. Dra. Gabriella Massolini (Università degli Studi di Pavia) por me receber tão bem em seu país, laboratório e grupo de pesquisa (Dipartimento di Scienze del Farmaco). Obrigada pela confiança, acolhimento carinhoso e amizade.

À amiga e Profa. Dra. Ariela Veloso de Paula (Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara) pelo cuidado especial por minha vida. Agradeço principalmente pela atenção dada à distância que tanto me fortaleceu durante o meu período de estágio no exterior.

Aos amigos e companheiros de laboratório Juliana, Natália, Elen, Julián, Ana Nasser, Fernando, Eddyn, Thamyres, Cauê e Maísa. Pelas risadas, lembranças, lágrimas, colaboração,

companhia, almoços, jantares, apoio e amizade. Minha eterna gratidão por tê-los em minha vida durante esses 4 anos de doutorado.

Aos professores Dr. Luís Henrique Souza Guimarães (USP de Ribeirão Preto) e Dr. Ricardo José de Mendonça (Universidade Federal do Triângulo Mineiro) pela colaboração nas análises MALDI-TOF dos peptídeos.

À amiga Aline Buda e sua família pela receptividade e acolhimento em Araraquara. Eternas boas lembranças ficarão em minha memória.

À Profa. Dra. Taís Maria Bauab e ao doutorando Matheus Aparecido dos Santos Ramos (Departamento de Alimentos e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara) pela colaboração nos ensaios antifúngicos dos peptídeos.

À amiga e companheira Carina Zuppa por tornar os meus dias mais tranquilos na Itália durante o período de doutorado sanduíche. Obrigada por ser tão especial. Presente de Deus em minha vida!

À CNPQ (Processo 141137/2014-2) pela indispensável bolsa de estudo concedida.

À CAPES (Processo 88881.132260/2016-01) pelo apoio financeiro para que eu pudesse realizar o meu Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE).

À FAPESP (Processo 2012/07680-4 e 2014/12563-2) pelo suporte financeiro.

Ao Instituto de Química e Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara, UNESP, pela infraestrutura e oportunidade oferecida. Muito obrigada aos professores e funcionários destas instituições pelo conhecimento oferecido e ajuda nos momentos em que foram solicitados, além do suporte técnico. Agradeço especialmente a equipe da pós-graduação em Biotecnologia por serem sempre tão prestativos.

A todos não citados, mas que direta ou indiretamente fizeram parte de minha trajetória e colaboraram para a conclusão desse trabalho.

**A todos o meu *MUITO OBRIGADA!***

Se você for tentar, vá até o fim. Senão, nem comece. Vá até o fim. Isso pode significar perder amores, amigos, empregos e talvez até a cabeça. Vá até o fim. Isso pode significar três ou quatro dias sem comer. Isso pode significar congelar no banco de um parque. Isso pode significar deboche, rejeição, solidão. Solidão? Pense nela como um presente. E em todo o resto como um teste à sua persistência. O tamanho da sua vontade de chegar lá. Você vai chegar. E vai ser melhor que qualquer coisa que você possa imaginar. Vá até o fim. Você nunca estará sozinho.

*Charles Bukowsk/Adaptação Comercial da Shell*

## RESUMO

O atual trabalho teve como objetivo realizar a hidrólise das proteínas do soro do queijo bovino (SQB) utilizando a alcalase® imobilizada em pó de sabugo de milho, para obtenção, purificação parcial e avaliação das propriedades biológicas de peptídeos bioativos. O sabugo de milho (SM) é o principal resíduo formado da indústria de processamento de milho. Alcalase® foi usada para a imobilização em SM e agarose. O desempenho dos dois derivados foi estudado em relação aos parâmetros cinéticos de imobilização. A hidrólise das proteínas do SQB em sistema descontínuo foi realizada em reator de batelada (pH 9,0; 50°C/48h) usando a alcalase® livre (AL) e derivados alcalase®-glioxil-agarose (AGA); alcalase®-glioxil-SM (AGSM) para fins de comparação. O grau de hidrólise (GH) para AL, AGA e AGSM foi de 59,63, 43,88 e 26,59% respectivamente. O derivado estável AGSM apresentou capacidade de cinco ciclos de reuso de 24 h consecutivos mantendo atividade maior que 70% e exibiu estabilidade térmica (65°C/pH 7,0) 62 vezes maior do que a AL, retendo 12% de sua atividade inicial após 48 horas, enquanto que a AL e AGA foram totalmente inativados. Os hidrolisados proteicos do soro (HPS) obtidos com AGSM foram fracionados por RP-HPLC em três frações (F1, F2 e F3) de acordo com a hidrofiliçidade dos peptídeos (F1: hidrofílicos, F2: hidrofiliçidade intermediária e F3: hidrofóbicos). As frações foram analisadas por MALDI-TOF que identificou peptídeos de massa molecular (<1500 m/z). HPS obtido por AGSM antes do fracionamento apresentou elevada capacidade de redução do radical ABTS (57,82%) e elevada atividade quelante de ferro II (76,2%). Houve diferença significativa ( $P < 0.001$ ) na atividade antioxidante entre as três frações (F1>F2<F3) e a atividade quelante de ferro para as frações (F1, F2 e F3) foram nulas. As espécies *E. coli* (ATCC 43895) e *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644) foram susceptíveis à ação dos peptídeos obtidos neste presente estudo. Os peptídeos de hidrofiliçidade intermediária (F2) apresentaram maior atividade antimicrobiana, tanto para *E. coli* quanto para *L. monocytogenes*, sendo mais efetivos contra a segunda ( $p < 0,05$ ). Apenas F2 mostrou ser efetivo contra a cepa de *Candida albicans* ATCC 18804 testada (MIC= 10 mg/mL). Para a hidrólise das soroproteínas em sistema contínuo (50°C/pH 9,0), empregou-se um reator de leito empacotado (PBR), contendo 25 g do derivado AGSM (8,66 U/g). Foi feita a caracterização hidrodinâmica do reator utilizando o corante vermelho de fenol (0,6 g.L<sup>-1</sup>) como traçador. O PBR operou numa vazão de 6 mL.h<sup>-1</sup>, o que representou um tempo de residência de 12,9 h, aproximadamente 19% maior do que o tempo espacial (10,8 h). Portanto, a formação de caminhos preferenciais foi mínima e o sistema apresentou alto grau de hidrólise (58,98-70,70%) durante 180 horas de reação. O tempo de meia-vida do derivado AGSM foi bastante elevado (246 h) e foram obtidos peptídeos bioativos de massa molecular (<2600 m/z) com alta capacidade antioxidante (65,27% de redução de ABTS). Neste trabalho, o SM apresentou grande potencial como suporte de baixo custo para a imobilização de alcalase®. Os resultados deste estudo mostram que a hidrólise das proteínas do SQB utilizando o derivado AGSM foi possível para sistemas descontínuos e contínuos. O processo utilizado evidencia uma grande perspectiva para a indústria alimentícia e farmacêutica, pois, além de contribuir para a melhoria do meio ambiente pelo reuso do sabugo, possibilita reutilização do soro e obtenção de peptídeos bioativos com elevada capacidade antioxidante e antimicrobiana.

## ABSTRACT

The objective of the present work was to hydrolyze bovine cheese whey proteins (BCW) using the alcalase® immobilized on corn cob powder (CCP), to obtain partial purification and evaluation of the biological properties of bioactive peptides. Corn cob (CC) is the main residue formed in the maize processing industry. Alcalase® was used for the immobilization on CCP and on agarose. The performance of the two derivatives enzymatic was studied in relation to the kinetic properties of immobilization. The free alcalase® (FA) and the derivatives: alcalase®-glyoxyl-agarose (AGA); alcalase®-glyoxyl-corn-cob-powder (AGCCP) were used for the hydrolysis of bovine cheese whey proteins in a batch reactor (pH 9.0, 50°C/48h). The degree of hydrolysis (DH) for FA, AGA and AGCCP was of 59.63, 43.88 and 26.59% respectively. However, AGCCP derivative was very stable and presented reuse capacity of five consecutive 24-hour cycles maintaining its activity greater than 70%. In addition, AGCCP exhibited thermal stability (65°C, pH 7.0) 62 times greater than FA, retaining 12% of its initial activity after 48 hours, while FA and AGA were totally inactive. The whey protein hydrolysates (WPH) obtained with AGCCP were fractionated by reverse-phase HPLC according to the hydrophilicity of the peptides (F1: hydrophilic, F2: intermediate hydrophilicity and F3: hydrophobic). The fractions were analyzed by MALDI-TOF and molecular weight peptides (<1500 m/z) were identified. Total WPH obtained by AGCCP presented high capacity reduction of the ABTS radical (57.82%) and high chelating activity of iron II (76.2%). A significant difference ( $P < 0.001$ ) in the antioxidant activity between the three fractions (F1>F2>F3) was observed while the chelating activity of iron for the all fractions (F1, F2, and F3) was null. The obtained peptides showed high antimicrobial activity (87.75-100%) against the species *E. coli* (ATCC 43895) and *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644). Only F2 was effective against the *Candida albicans* strain ATCC 18804 tested (MIC=10 mg/mL). A packed bed reactor (PBR) containing 25 g of the AGCCP derivative (8.66 U/g) was used for the hydrolysis of whey proteins in a continuous system process (50°C/pH 9.0). The hydrodynamic characterization of the reactor was performed using red phenol dye (0.6 g.L<sup>-1</sup>) as a tracer. The PBR operated at a flow rate of 6 mL.h<sup>-1</sup>, which represented a residence time of 12.9 h, approximately 19% higher than the spatial time value (10.8 h). Therefore, the formation of preferential paths was minimal and the system presented a high degree of hydrolysis (58.98-70.70%) during 180 hours of reaction. The half-life of the AGSM derivative was very high (246 h) and bioactive peptides of molecular weight (<2600 m/z) with high antioxidant capacity (65.27% ABTS reduction) were obtained. In this work, CCP presented great potential as a low cost support for alcalase® immobilization. The results of this study show that the hydrolysis of SQB proteins using the AGSM derivative was possible for discontinuous and continuous systems. The process used shows a great prospect for the food and pharmaceutical industry, as well as contributing to the improvement of the environment by the reuse of the cob, allows the reuse of the whey and the obtaining of bioactive peptides with high antioxidant and antimicrobial capacity.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b>	Representação da estrutura tridimensional da alcalase®.....	<b>25</b>
<b>Figura 2-</b>	Mecanismo de ação da alcalase®.....	<b>25</b>
<b>Figura 3-</b>	Principais métodos de imobilização de enzimas.....	<b>27</b>
<b>Figura 4-</b>	Efeito da imobilização covalente multipontual na estabilidade da enzima...	<b>28</b>
<b>Figura 5-</b>	Relação entre suporte e enzima.....	<b>29</b>
<b>Figura 6-</b>	Estrutura química básica da agarose, formada por repetidas unidades de agarobiose.....	<b>30</b>
<b>Figura 7-</b>	Desprotonação dos grupos $\epsilon$ -amino das lisinas, após incubação em pH 10,0. Em pH 8,0-9,0, apenas o grupamento amino-terminal encontra-se reativo.....	<b>31</b>
<b>Figura 8-</b>	Ilustração de uma enzima hipotética, imobilizada em glioxil-agarose. A redução com borohidreto de sódio torna irreversíveis as ligações imino formadas entre enzima e suporte.....	<b>32</b>
<b>Figura 9-</b>	Parede celular de vegetais: composição química.....	<b>33</b>
<b>Figura 10-</b>	Considerações importantes para a seleção de um biorreator.....	<b>36</b>
<b>Figura 11-</b>	Biorreatores para biocatalisadores imobilizados.....	<b>37</b>
<b>Figura 12-</b>	Reator descontínuo de mistura total: perfil de concentração de substrato e de produto.....	<b>38</b>
<b>Figura 13-</b>	Representação da ligação entre um quelante e metal.....	<b>42</b>
<b>Figura 14-</b>	Fluxograma das etapas realizadas no presente trabalho.....	<b>44</b>
<b>Figura 15-</b>	Reação simplificada de formação de grupos gliceril na celulose a partir da adição de glicidol e hidróxido de sódio.....	<b>46</b>
<b>Figura 16-</b>	Reação simplificada de formação de grupos glioxil a partir da oxidação com periodato de sódio.....	<b>46</b>
<b>Figura 17-</b>	Hidrólise do substrato sintético boc-Ala-ONp utilizando a enzima alcalase®.....	<b>48</b>

<b>Figura 18-</b>	Fluxograma simplificado da configuração correspondente ao PBR para a hidrólise das proteínas do soro do queijo em sistema contínuo utilizando o derivado AGSM. Utilizou-se reator de vidro encamisado PBR (diâmetro interno= 2 cm e h= 22,5 cm; volume útil= 65 mL; T= 50°C; vazão= 6mL.h <sup>-1</sup> ; massa= 25 g de AGSM). <b>AL</b> = alcalase® livre; <b>AGSM</b> = derivado alcalase®-gloxil-SM; <b>HP</b> = hidrolisado proteico; <b>SQB</b> = soro de queijo bovino.....	<b>51</b>
<b>Figura 19-</b>	Estabilidade térmica a 65°C da alcalase® livre e derivados.....	<b>60</b>
<b>Figura 20-</b>	Ciclos de reuso dos derivados estáveis AGSM e AGA. Cada ciclo ocorreu por 24 horas de hidrólise das soroproteínas de queijo (50°C/pH 9,0).....	<b>61</b>
<b>Figura 21-</b>	Grau de hidrólise obtido pela hidrólise das soroproteínas em sistema descontínuo usando AL (0,5 mL; 8,23 U/mL), AGA (0,5 g; 13,8 U/g) e AGSM (0,5 g; 9,54 U/g) em diferentes tempos de reação. Para cada ensaio foram utilizados 20 ml de soro de queijo tratado (pH 9,0; 50°C/48h; 100 rpm).....	<b>63</b>
<b>Figura 22-</b>	SDS-PAGE 12%: perfil eletroforético das proteínas do soro de queijo bovino e dos hidrolisados proteicos do soro. (1) Padrões de massa molar. (2) Soro do queijo bovino. Tempo de hidrólise em horas usando <b>AL</b> : (3): 3h; (4): 6h; (5): 12h; (6): 24h; (7): 48h; <b>AGA</b> : (8): 3h; (9): 6h; (10): 12h; (11): 24h; (12): 48h e <b>AGSM</b> : (13): 3h; (14): 6h; (15): 12h; (16): 24h; (17): 48h. Ig: imunoglobulina; BSA: albumina de soro bovino; α-La: alfa-lactalbumina; β-Lg: beta-lactoglobulina.....	<b>64</b>
<b>Figura 23-</b>	RP-HPLC do soro não hidrolisado (A) e hidrolisados proteicos obtidos com AL (B); AGA (C) e AGSM (D) após 48 h de hidrólise em sistema descontínuo. Utilizou-se gradiente linear de 5 a 95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 minutos, fluxo de 1,0 mL/min e detecção a 220 nm.....	<b>65</b>
<b>Figura 24-</b>	Fracionamento dos peptídeos por RP-HPLC. Frações (F1), (F2) e (F3) obtidas com AGSM em RB após 48 h de hidrólise. Foi feito em modo semi-preparativo com coluna de fase reversa Júpiter Phenomenex C18 (250 x 10 mm; 15 µm; 300 Å) e detecção a 220 nm. Utilizou-se gradiente de 1 a 90% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA), fluxo de 3,0 mL/min em 70 minutos.....	<b>66</b>
<b>Figura 25-</b>	Espectro MALDI-TOF para as frações F1, F2 e F3.....	<b>67</b>
<b>Figura 26-</b>	Atividade antioxidante do HPS (antes do fracionamento) e frações (F1), (F2) e (F3) utilizando AGSM após 48 h de hidrólise em RB.....	<b>68</b>
<b>Figura 27-</b>	Atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos obtidos pelos ensaios de reuso utilizando AGSM na hidrólise descontínua das proteínas do soro. Em cada ciclo 1,0 g do derivado foi adicionado a 20 mL de soro e incubado a 50°C, pH 9,0 e 100 rpm de agitação durante 24 horas.....	<b>70</b>

<b>Figura 28-</b>	Atividade quelante de íons ferro do HPS (antes do fracionamento) e das frações (F1), (F2) e (F3) utilizando AGSM após 48 h de hidrólise em RB..	<b>71</b>
<b>Figura 29-</b>	Atividade antifúngica contra a cepa de <i>C. albicans</i> ATCC 18804 do HPS (antes do fracionamento) e das frações (F1), (F2) e (F3) utilizando AGSM após 48 h de hidrólise em RB. As amostras foram avaliadas nas concentrações de 10 a 0,07 mg/mL (diluição seriada). Como controle positivo foi utilizado anfotericina B (16,0 a 0,06 µg/mL) e o fluconazol (512 a 1,0 µg/mL).....	<b>76</b>
<b>Figura 30-</b>	Teste de traçador do tipo pulso visando-se à caracterização hidrodinâmica do reator de leito empacotado em diferentes tempos, em que a= tempo inicial correspondente à injeção do traçador; (b), (c) e (d)= tempos intermediários; (e)= final do experimento.....	<b>78</b>
<b>Figura 31-</b>	Curva E (t) de distribuição do tempo de residência em função do tempo de ensaio.....	<b>79</b>
<b>Figura 32-</b>	Grau de hidrólise obtido pela hidrólise das soroproteínas em sistema contínuo utilizando o derivado AGSM em diferentes tempos de reação. Utilizou-se reator de vidro encamisado PBR (diâmetro interno= 2 cm e h= 22,5 cm; volume útil= 65 mL; T= 50°C; vazão= 6mL.h <sup>-1</sup> ; massa= 25 g de AGSM).....	<b>82</b>
<b>Figura 33-</b>	SDS-PAGE 12%: perfil eletroforético do soro de queijo bovino e hidrolisados proteicos obtidos com AGSM em PBR. (P) padrões de massa molar; (O) SQB. Tempo em horas de hidrólise no reator: (A) 30; (B) 45; (C): 60; (D): 75; (E): 90; (F): 105; (G): 120; (H): 135; (I): 150; (J): 165; (K): 180. Ig: imunoglobulina; BSA: albumina de soro bovino; α-La: alfa-lactalbumina; β-Lg: beta-lactoglobulina.....	<b>83</b>
<b>Figura 34-</b>	RP-HPLC de hidrolisados proteicos obtidos com AGSM em sistema contínuo após diferentes tempos de hidrólise. A= 30h; B= 45-165h e C= 180 h.....	<b>84</b>
<b>Figura 35-</b>	RP-HPLC das proteínas do SQB e da beta-lactoglobulina (β-Lg).....	<b>84</b>
<b>Figura 36-</b>	Atividade antioxidante de hidrolisados proteicos do soro obtidos por AGSM utilizando PBR em diferentes tempos de hidrólise.....	<b>85</b>
<b>Figura 37-</b>	Linearização do grau de hidrólise em função do tempo de reação no estado estacionário.....	<b>87</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b>	Uso de enzimas imobilizadas.....	<b>26</b>
<b>Tabela 2-</b>	Principais propriedades do suporte que influenciam o desempenho de um sistema de imobilização enzimático.....	<b>29</b>
<b>Tabela 3-</b>	Classificação dos suportes quanto à composição química.....	<b>30</b>
<b>Tabela 4-</b>	Utilização de resíduos lignocelulósicos como suporte para a imobilização de enzimas: principais trabalhos encontrados na literatura.....	<b>34</b>
<b>Tabela 5-</b>	Classificação dos reatores enzimáticos multifásicos em função do regime de operação e das características hidrodinâmicas.....	<b>36</b>
<b>Tabela 6-</b>	Peptídeos bioativos derivados das proteínas do soro de leite.....	<b>41</b>
<b>Tabela 7-</b>	Caracterização cinética da enzima livre e dos derivados usando o substrato sintético boc-Ala-ONp.....	<b>56</b>
<b>Tabela 8-</b>	Perfil de imobilização da alcalase® em agarose e SM.....	<b>56</b>
<b>Tabela 9-</b>	pH ótimo da alcalase®.....	<b>59</b>
<b>Tabela 10-</b>	Atividade antibacteriana do HPS (antes do fracionamento) e das frações (F1), (F2) e (F3) dos peptídeos obtidos com AGSM após 48 h de hidrólise em RB.....	<b>73</b>
<b>Tabela 11-</b>	Diferentes resultados de graus de hidrólise encontrados na literatura.....	<b>81</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABTS**= ácido 2,2 azino bis (3-etilbenzotiazolina-ácido 6 sulfônico)
- ACN**= acetonitrila
- AGA**= alcalase®-glioxil-agarose
- AGCCP**= alcalase®-glyoxyl-corn-cob-powder
- AGSM**= alcalase®-glioxil-SM
- AL**= alcalase® livre
- AR (%)**= atividade recuperada
- ASBRAN**= Associação Brasileira de Nutrição
- ATCC**= American Type Culture Collection
- BHA**= butil-hidroxi-anisol
- BHT**= butil-hidroxi-tolueno
- Boc-Ala-ONp**= éster-paranitrofenílico de N-butiloxicarbonil-L-alanina
- BSA**= albumina do soro bovino
- BSTR**= reator de tanque agitado (modo batelada)
- CaCl<sub>2</sub>**= cloreto de cálcio
- CHCA**= ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico
- CSTR**= reator de tanque agitado (modo contínuo)
- Da**= Dalton
- DQO**= Demanda Química Oxigênio
- F1**= fração 1 (peptídeos hidrofílicos)
- F2**= fração 2 (peptídeos de hidrofiliabilidade intermediária)
- F3**= fração 3 (peptídeos hidrofóbicos)
- FA**= free alcalase®
- FBR**= reator de leito fluidizado
- FeCl<sub>2</sub>**= cloreto de ferro II
- GH**= grau de hidrólise (%)
- HP**= hidrolisado proteico
- HPS**= hidrolisado proteico do soro
- Ig**= imunoglobulinas
- kDa**= Kilo Dalton
- KI**= iodeto de potássio
- K<sub>m</sub>** = constante de Michaelis

**Lf**= lactoferrina

**LPO**= lactoperoxidase

**M**= molar

**mM**= milimolar

**MALDI-TOF**= Matrix Associated Laser Desorption-Ionization - Time of Flight

**MIC**= concentração inibitória mínima

**NaBH<sub>4</sub>**= borohidreto de sódio

**NaIO<sub>4</sub>**= periodato de sódio

**NaOH**= hidróxido de sódio

**PBR**= reator em leito empacotado

**PG**= propil galato

**pH**= potencial hidrogeniônico

**RB**= reator em batelada

**RI (%)**= rendimento de imobilização

**RP-HPLC**= Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa

**SM**= sabugo de milho

**SQB**= soro de queijo bovino

**STR**= reator de tanque agitado

**TBHQ**= terc-butilhidroquinona

**TCA**= ácido tricloroacético

**TNBS**= ácido trinitrobenzeno sulfônico

**TFA**= ácido trifluoracético

**Trolox**= ácido 6- hidroxi-2-5-7-8 tetrametilcromo 2-carboxílico

**U**= unidades enzimáticas

**V<sub>max</sub>**= velocidade maxima

**α-La**= α-lactalbumina

**β-Lg**= β-lactoglobulina

**ε**= coeficiente de absorvidade molar

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>21</b>
<b>1.1</b>	<b>Proteínas do soro de queijo bovino.....</b>	<b>22</b>
<b>1.2</b>	<b>Alcalase®.....</b>	<b>24</b>
<b>1.3</b>	<b>Imobilização de enzimas.....</b>	<b>25</b>
<b>1.4</b>	<b>Suportes para imobilização de enzimas.....</b>	<b>28</b>
1.4.1	Agarose.....	30
1.4.2	Resíduos lignocelulósicos.....	32
1.4.2.1	Milho e sabugo de milho.....	34
<b>1.5</b>	<b>Reatores enzimáticos.....</b>	<b>35</b>
1.5.1	Tipos de reatores enzimáticos.....	37
1.5.1.1	Reatores descontínuos.....	38
1.5.1.2	Reatores contínuos.....	39
<b>1.6</b>	<b>Peptídeos bioativos.....</b>	<b>40</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>43</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral.....</b>	<b>43</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>43</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>43</b>
<b>3.1</b>	<b>Material.....</b>	<b>43</b>
<b>3.2</b>	<b>Métodos.....</b>	<b>44</b>
<b>3.3</b>	<b>Preparo do soro de queijo bovino.....</b>	<b>45</b>
<b>3.4</b>	<b>Tratamento do suporte pó de sabugo de milho.....</b>	<b>45</b>
<b>3.5</b>	<b>Ativação dos suportes agarose e pó de sabugo de milho.....</b>	<b>45</b>
<b>3.6</b>	<b>Quantificação de grupos aldeídos.....</b>	<b>46</b>
<b>3.7</b>	<b>Imobilização: preparo dos derivados alcalase®-glioxil-agarose (AGA) e alcalase®-glioxil-SM (AGSM).....</b>	<b>47</b>
<b>3.8</b>	<b>Ensaio de atividade enzimática.....</b>	<b>47</b>
<b>3.9</b>	<b>Caracterização cinética da enzima livre e dos derivados.....</b>	<b>48</b>
3.9.1	Parâmetros cinéticos.....	48
<b>3.9.2</b>	<b>pH ótimo.....</b>	<b>48</b>
3.9.3	Estabilidade térmica.....	48
3.9.4	Reuso.....	48
<b>3.10</b>	<b>Hidrólise enzimática das proteínas do soro de queijo bovino.....</b>	<b>49</b>
3.10.1	Reator em batelada (RB).....	49
3.10.2	Reator de leito empacotado (PBR).....	49
3.10.2.1	Caracterização hidrodinâmica do PBR.....	50
3.10.2.2	Estabilidade operacional.....	51
<b>3.11</b>	<b>Caracterização e quantificação do soro e hidrolisados.....</b>	<b>52</b>
3.11.1	Determinação de lactose.....	52

3.11.2	Determinação de proteínas.....	52
3.11.3	Grau de hidrólise (GH).....	52
3.11.4	SDS-PAGE 12%.....	52
3.11.5	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (RP-HPLC).....	53
<b>3.12</b>	<b>Fracionamento dos peptídeos por RP-HPLC.....</b>	<b>53</b>
<b>3.13</b>	<b>Análise MALDI-TOF.....</b>	<b>53</b>
3.14	Avaliação da atividade biológica.....	54
3.14.1	Atividade antioxidante pelo método do radical ABTS (2,2'-azino-bis (3- etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico).....	54
3.14.2	Atividade quelante de íons ferro.....	54
3.14.3	Atividade antibacteriana.....	55
3.14.4	Atividade antifúngica.....	55
<b>3.15</b>	<b>Estatística.....</b>	<b>55</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>56</b>
<b>4.1</b>	<b>Ativação dos suportes agarose e pó de sabugo de milho.....</b>	<b>56</b>
<b>4.2</b>	<b>Imobilização multipontual da alcalase®.....</b>	<b>57</b>
<b>4.3</b>	<b>Caracterização cinética da alcalase®.....</b>	<b>58</b>
<b>4.4</b>	<b>Estabilidade térmica e reuso.....</b>	<b>60</b>
<b>4.5</b>	<b>Dosagem de lactose e proteínas no soro tratado.....</b>	<b>61</b>
<b>4.6</b>	<b>Reator em batelada: sistema descontínuo.....</b>	<b>62</b>
4.6.1	Caracterização dos hidrolisados proteicos obtidos em sistema descontínuo.....	62
4.6.1.1	Grau de hidrólise (GH).....	62
4.6.1.2	SDS-PAGE e RP-HPLC.....	63
4.6.1.3	Fracionamento dos hidrolisados por RP-HPLC e análise MALDI-TOF.....	65
4.6.2	Atividade Biológica.....	67
4.6.2.1	Atividade antioxidante.....	67
4.6.2.2	Atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos obtidos após ensaio de reuso	70
4.6.2.3	Atividade quelante de íons ferro.....	71
4.6.2.4	Atividade antibacteriana.....	72
4.6.2.5	Atividade antifúngica.....	75
<b>4.7</b>	<b>Reator de leito empacotado: sistema contínuo.....</b>	<b>77</b>
4.7.1	Caracterização hidrodinâmica do sistema PBR.....	77
4.7.2	Caracterização dos hidrolisados proteicos obtidos em sistema contínuo.....	79
4.7.2.1	Grau de hidrólise (GH).....	79
4.7.2.2	SDS-PAGE e RP-HPLC.....	82
4.7.2.3	ABTS.....	85
4.7.2.4	Análise MALDI-TOF.....	85
4.7.2.5	Estabilidade operacional.....	86
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>87</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>89</b>
	<b>APÊNDICES.....</b>	<b>100</b>

## INTRODUÇÃO

O soro do leite bovino é um efluente líquido amarelado resultante da co-precipitação e remoção da caseína no processo da fabricação de queijo. São gerados em média, 9 kg de soro a partir de 1 kg de queijo (REMÓN; GARCÍA; ARAUZO; 2016; FOX et al., 2017). Este subproduto possui grande valor nutricional devido à presença de lactose (4,5-6%), proteínas (0,6-1,1%), minerais (0,8-1%), ácido lático (0,05-0,9%), gorduras (0,06-0,5%) e água (93-94%). Apresenta elevados valores de Demanda Química Oxigênio (DQO) e, portanto, não deve ser descartado diretamente no meio ambiente sem tratamento, pois pode gerar grave problema ambiental, além de grande desperdício de nutrientes (ROHLFES et al., 2014; BRANDELLI; DAROIT; CORRÊA, 2015).

Segundo a Associação Brasileira de Nutrição (ASBRAN), são produzidos cerca de 200 milhões de toneladas de soro no mundo por ano, dos quais 3 milhões no Brasil. O descarte adequado do soro de queijo no meio ambiente tem sido atualmente considerado uma questão muito importante devido à existência de leis mais rigorosas e responsabilidades exigidas pela eliminação deste resíduo (REMÓN; GARCÍA; ARAUZO; 2016).

Sem tratamento, o soro de queijo pode ser utilizado na suplementação alimentar de animais e na formulação de fertilizantes. Após tratamento preliminar, pode ser usado na panificação, produção de xaropes de glicose e galactose, embutidos e sorvetes, em processos fermentativos (leites, vinhos e cervejas), no enriquecimento de sucos de fruta e refrigerantes, na formulação de dietas enterais, bebidas lácteas, entre outros (TARDIOLI, 2003; KOSSEVA et al., 2009). Uma alternativa para minimizar o impacto ambiental e aproveitar as propriedades nutritivas do soro é utilizar este resíduo na obtenção de novos produtos (SILVESTRE et al., 2012; ROHLFES et al., 2014; YADAV et al., 2015). Neste contexto, destacam-se os peptídeos bioativos.

Peptídeos bioativos são fragmentos de proteínas específicas que possuem impacto positivo sobre a saúde. Apresentam estrutura com sequência de 2-20 resíduos de aminoácidos e massas moleculares inferiores a 6000 Da (KORHONEN; PIHLANTO, 2006; SARMADI; ISMAIL, 2010) sendo a hidrólise de proteínas nativas utilizando enzimas proteolíticas a maneira mais comum de sua obtenção (MÖLLER et al., 2008; NAJAFIAN; BABJI, 2014; RIPOLLES et al., 2015). Atualmente, as proteínas do soro do leite têm sido consideradas a fonte mais importante desses compostos (NAGPAL, et al., 2011; BRANDELLI; DAROIT; CORRÊA, 2015).

Recentemente, já existem no mercado internacional produtos lácteos comerciais e ingredientes com apelo funcional baseado em peptídeos bioativos obtidos das proteínas do leite (caseínas e soroproteínas). Como exemplos podem ser citados, respectivamente, os produtos comercializados, a funcionalidade e os fabricantes: Biozate (redução da pressão sanguínea; Davisco, EUA), Cystein peptide (aumento de energia e redução do sono; DMV International, Holanda) e Vivinal Alpha (relaxante; Borculo Domo Ingredientes, Holanda) (SPADOTI et al., 2009).

### 1.1 Proteínas do soro de queijo bovino

As proteínas do soro de queijo bovino apresentam estrutura globular contendo pontes de dissulfeto que as conferem certo grau de estabilidade estrutural. As frações proteicas são compostas de  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ - Lg),  $\alpha$ -lactalbumina ( $\alpha$ -La), albumina do soro bovino (BSA), imunoglobulinas (Ig), lactoferrina (Lf) e lactoperoxidase (LPO). Estas proteínas apresentam variações no tamanho, massa molecular (de 14 à 1000 kDa) e funções biológicas específicas (HARAGUCHI; ABREU; PAULA, 2006; YADAV et al., 2015).

A  $\beta$ - Lg é a proteína principal e mais abundante no soro. No pH do leite que é, aproximadamente, 6,68 ela é um dímero de massa molecular 36 kDa e é formada pela associação de duas subunidades globulares idênticas de massa molecular 18 kDa. Cada unidade possui estrutura primária que é constituída de 162 resíduos de aminoácidos no qual estão presentes duas ligações dissulfeto intramoleculares que unem o resíduo de aminoácido 66 ao 160 e o 106 ao 121. A estrutura secundária dessa mesma proteína parece ser formada por 15% de  $\alpha$ -hélice, 50% de folhas  $\beta$  e de 15% a 20% de voltas  $\beta$  (MARQUES, 2005; HERNÁNDEZ-LEDESMA; RECIO; AMIGO, 2008; SOUZA, 2013; WIJAYANTI et al., 2015).

A  $\alpha$ -La é o componente que representa a segunda maior fração proteica do soro (15-25% das proteínas totais), com massa molecular de 14 kDa de fácil e rápida digestão. É considerada a proteína mais estável do soro quando esse é submetido a tratamentos térmicos. Apresenta 123 resíduos de aminoácidos e é rica em lisina, treonina, triptofano e cisteína. Possui ponto isoelétrico de 5,1 e quatro ligações dissulfeto intramoleculares que unem os resíduos 6 e 120, 28 e 111, 61 e 77 e 73 e 91 (HARAGUCHI; ABREU; PAULA, 2006; SOUZA, 2013; YADAV et al., 2015).

A BSA tem conformação globular solúvel em água e é formada por uma cadeia polipeptídica constituída de aproximadamente 580 resíduos de aminoácidos de massa

molecular 66,2 kDa, com ponto isoelétrico de 4,7 a 4,8. Sua estrutura secundária contém cerca de 54% de  $\alpha$ -hélice e 40% de folhas  $\beta$  e voltas  $\beta$ . É uma proteína que possui grupo sulfidrílico no segmento amino-terminal e 17 ligações dissulfeto intramoleculares confinadas no interior da conformação. Possui função carreadora de ácidos graxos insolúveis no sistema circulatório, o que auxilia na manutenção de sua estabilidade, evitando a desnaturação (SOUZA, 2013). Também pode ligar-se a outros lipídeos e a substâncias responsáveis por “flavor”. Segundo Haraguchi, Abreu e Paula (2006), a BSA atua como relevante precursor da síntese de glutatona, tripeptídeo conhecido pela atividade antioxidante.

As Ig são classificadas como glicoproteínas, com massa molecular que varia de 15 a 1000 kDa. São formadas por monômeros de duas cadeias polipeptídicas de 20 kDa, cadeias leves, e duas cadeias polipeptídicas de 50 a 70 kDa, cadeias pesadas, unidas por ligações dissulfeto. O soro contém de 0,6 a 1,0 g/L de Ig. A esta fração proteica, que possui peptídeos de alta massa molecular, atribui-se a propriedade de atividade antioxidante. São proteínas bastantes termolábeis (CUSTÓDIO, 2001; HARAGUCHI; ABREU; PAULA, 2006).

A Lf é uma importante proteína presente no soro de leite, encontra-se ligada ao elemento ferro, tornando este inacessível aos micro-organismos. Apresenta massa molecular da ordem de 76 kDa e polimeriza-se rapidamente na presença de íons cálcio. Apresenta propriedades bacteriostáticas, atuando como efetivo inibidor do crescimento bacteriano (inibe crescimento de enterobactérias patogênicas), atividade antiviral, imunomodulatória, cicatrizante, anti-inflamatória, efeito anticâncer, atividade antioxidante (SOUZA, 2013; THÉOLIER et al., 2013).

A LPO é uma enzima que degrada o peróxido de hidrogênio e apresenta propriedades antibacterianas. Esta fração é considerada um componente funcional de produtos de soro. A lactoperoxidase tem sido objeto de vários estudos visando sua utilização como meio de controlar o desenvolvimento da acidez e mudanças de pH durante a estocagem refrigerada de iogurte e quanto à possibilidade de ser utilizada como conservante natural. Em combinação com outros conservantes, a lactoperoxidase é usada como ingrediente em pasta de dente para combater cáries (MADUREIRA et al., 2007; SOUZA, 2013).

A hidrólise de proteínas pode ser feita através de ácidos, bases e enzimas proteolíticas, sendo que essa última é preferencialmente usada em caso do produto final ter fins alimentícios. Dentre as principais vantagens da hidrólise enzimática estão: melhoramento das propriedades nutricionais e funcionais, pois o produto obtido (peptídeos e aminoácidos livres) pode ser utilizado na preparação de formulações para alimentos, produtos farmacêuticos e nutrição de esportistas; alteração da solubilidade, devido à formação de mistura de peptídeos

que podem ser melhores assimilados por micro-organismos facilitando assim, processos fermentativos; redução da resposta alergênica devido à hidrólise da  $\beta$ -lactoglobulina e  $\alpha$ -lactalbumina, principais alergênicos do leite (TARDIOLI, 2003; CASTRO; SATO, 2015).

## 1.2 Alcalase®

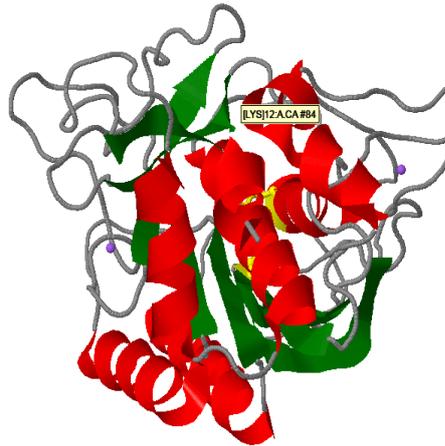
A alcalase® (EC 3.4.21.62), também conhecida como subtilisina A ou subtilisina Carlsberg, é uma serino-protease, formada por uma única cadeia polipeptídica com 274 resíduos de aminoácidos e massa molecular de aproximadamente 27 kDa (VOSSENBERG et al., 2012). É produzida por fermentação submersa do micro-organismo *Bacillus licheniformis* e foi desenvolvida pela Novo Nordisk (Bagsvaerd, Denmark) para a indústria de detergentes (SCHMIDT; SALAS-MELLADO, 2009). Trata-se de uma endopeptidase caracterizada por seu excelente desempenho em altas temperaturas e moderada alcalinidade, de ampla especificidade, além de ser de baixo custo, o que viabiliza a sua utilização (ZHENG et al., 2008).

Muitos estudos têm provado que a alcalase® é a melhor enzima utilizada na obtenção de hidrolisados proteicos (TANG et al., 2009; PESSATO et al., 2016; PIU et al., 2014; TARDIOLI et al., 2003) e peptídeos multifuncionais (LI; ALUKO, 2010; UDENIGWE; ALUKO, 2012; YOU et al., 2010). A temperatura e pH ótimos de hidrólise dessa enzima situam-se entre 50-70°C e 9,0-9,5, respectivamente (MARQUES, 2009).

A alcalase® é uma enzima especializada em clivar ligações peptídicas onde o lado carboxílico contém resíduos hidrofóbicos como leucina, tirosina e valina. Além disso, possui larga especificidade na clivagem de ligações peptídicas existentes entre glicina e histidina; serina e histidina; leucina e tirosina e tirosina e triptofano (ADAMSON; REINOLDS, 1996; KUKMAN; BLATNIK; ABRAM, 1995). O componente subtilisina Carlsberg hidrolisa uma variedade de ésteres de  $\alpha$ -L-aminoácidos (tirosina, fenilalanina, valina, arginina e outros), tendo maior especificidade por ésteres de aminoácidos aromáticos (COLOWICH; KAPLAN, 1970).

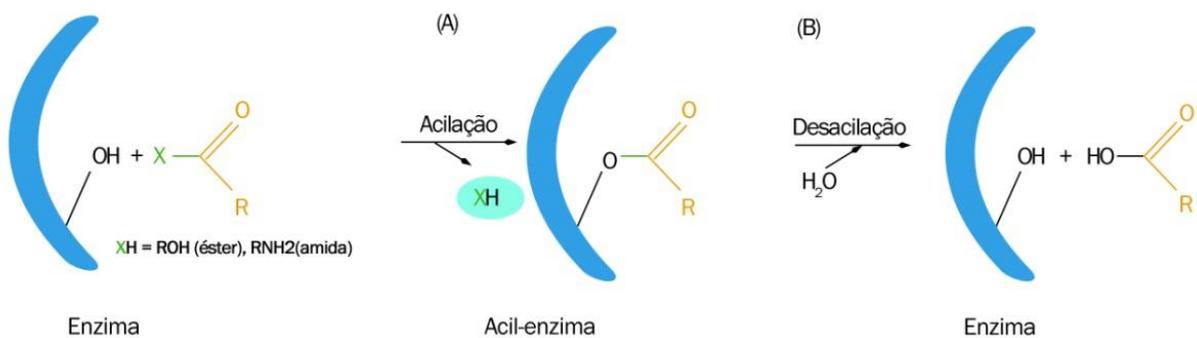
A estrutura tridimensional e o mecanismo de ação catalítico da alcalase® podem ser representados pelas Figuras 1 e 2.

**Figura 1.** Representação da estrutura tridimensional da alcalase®.



**Fonte:** <http://www.brendaenzymes.org/Mol/jsmol/index.php?pdb=1av7&ecno=3.4.21.62>.

**Figura 2.** Mecanismo de ação da alcalase®.



**Fonte:** Próprio autor modificado de Nelson (2008).

### 1.3 Imobilização de enzimas

A imobilização é um processo utilizado para confinar ou localizar por meio de métodos químicos e/ou físicos, a enzima em uma porção do espaço, com o intuito de manter (de forma a maximizar) sua atividade catalítica. Desta forma, entende-se por enzima imobilizada, aquela física ou quimicamente associada a um suporte ou matriz, usualmente sólida, insolúvel em água e inerte. O principal objetivo da imobilização é a possibilidade de reutilização da enzima, além de aumentar a sua estabilidade (COELHO; SALGADO; RIBEIRO, 2008).

Em comparação com as enzimas livres, as enzimas imobilizadas são mais robustas e mais resistentes a mudanças do ambiente reacional, incluindo influências de temperatura, pH e solventes orgânicos. Outras importantes vantagens das enzimas imobilizadas em

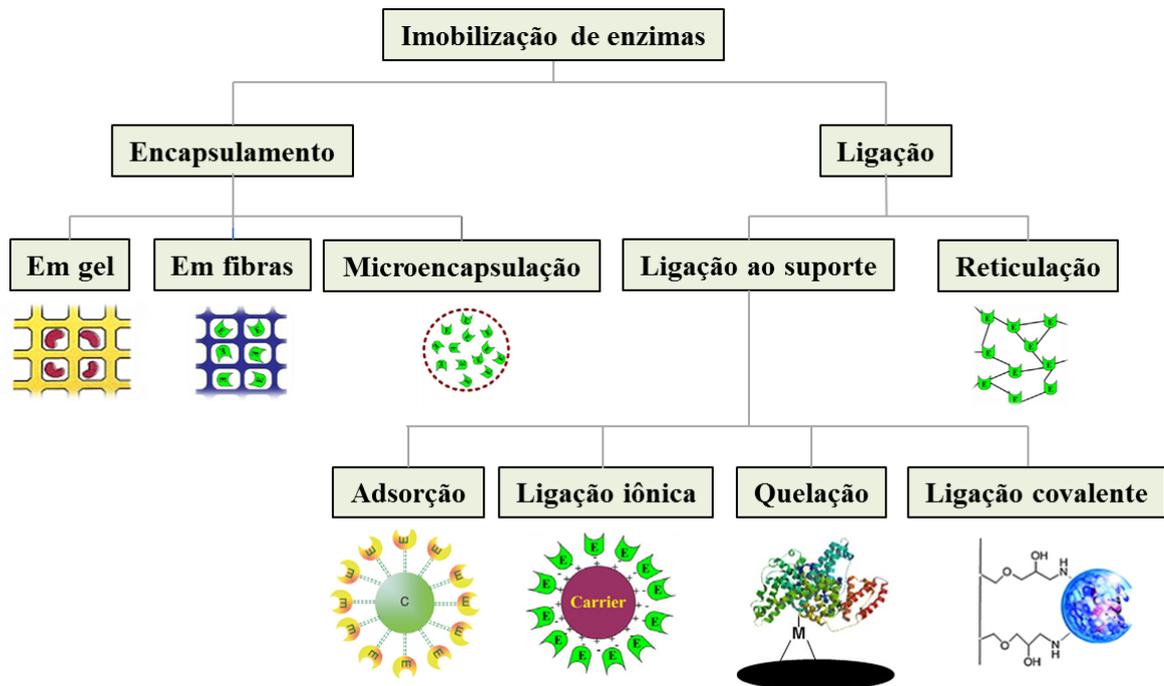
comparação com as enzimas livres são: possibilidade de reutilização do biocatalisador; facilidade de separação do catalisador e do produto da reação e de interrupção da reação, quando se atinge um determinado grau de conversão; além da possibilidade de conduzir processos contínuos (EŞ et al., 2015). As principais vantagens e desvantagens tecnológicas da utilização das enzimas imobilizadas encontram-se ilustradas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Uso de enzimas imobilizadas (COELHO; SALGADO; RIBEIRO, 2008).

<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
Desenvolvimento de sistemas contínuos	Custo adicional de suportes, reagentes e operação da imobilização
Maior estabilidade enzimática	Perdas da atividade durante a imobilização
Uso mais eficiente do catalisador através de reutilizações	Possíveis exigências adicionais de purificação do catalisador
Flexibilidade no projeto de reatores	Técnica pouco adequada a substratos insolúveis ou de alta massa molecular
Efluentes livres de catalisadores	Maiores riscos de contaminação na operação contínua dos reatores
Fácil separação entre produto e biocatalisador	Restrições difusionais e impedimento estéreo
Menor custo de mão de obra	
Facilidade de automação e controle	
Possibilidade de utilização das enzimas “ <i>in natura</i> ”	

Existem diversos métodos utilizados para a imobilização de enzimas. Os principais deles estão ilustrados na Figura 3.

**Figura 3.** Principais métodos de imobilização de enzimas.



**Fonte:** Próprio autor modificado de Bon; Ferrara; Corvo, 2008.

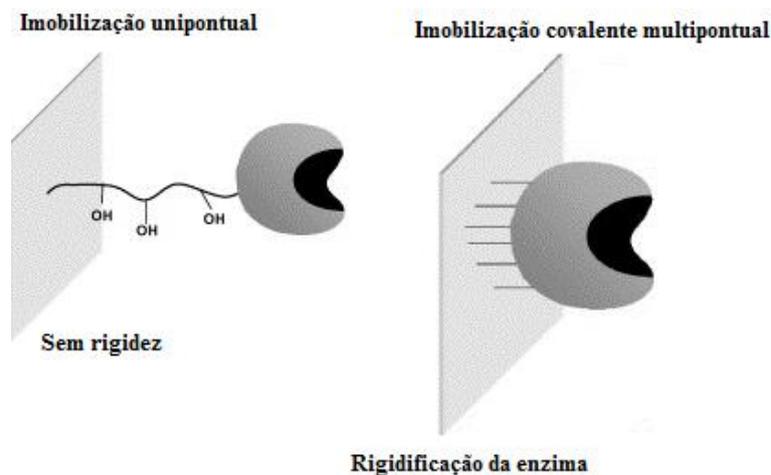
Dentre os métodos de imobilização disponíveis, a ligação covalente é o mais empregado. A imobilização multipontual de uma enzima consiste na formação de várias ligações covalentes entre uma molécula de enzima e diversos grupos ativos do suporte (BON; FERRARA; CORVO, 2008). Pode melhorar fortemente a estabilidade, a atividade e a seletividade da enzima. Os protocolos para a imobilização covalente frequentemente se iniciam com a modificação da superfície do suporte por meio de reações de ativação, na qual os grupos funcionais do suporte são modificados para produzir intermediários reativos (SOUZA et al., 2017).

A ligação covalente ocorre pela reação de grupos reativos do suporte, (matrizes como vidro, cerâmica, polímeros sintéticos, celulose, nylon e alumina, ativados ou não) com os grupos funcionais da enzima (ligação de grupos  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{SH}$ , entre outros). A escolha das condições irá depender da estabilidade da enzima e do suporte frente ao pH de formação das ligações covalentes, assim como da estabilidade das ligações suporte-enzima frente ao pH de utilização do sistema imobilizado. Este tipo de imobilização garante o não desprendimento da enzima ao suporte durante uso, ou seja, a irreversibilidade do método pela ação do pH, força iônica ou substrato. A maior desvantagem é a possibilidade de inativação

da enzima, em parte ou totalmente, quando a ligação se dá nos sítios ativos da mesma (COELHO; SALGADO; RIBEIRO, 2008; DATTA; CHRISTENA; RAJARAN, 2013).

Muitas enzimas industriais têm sido altamente estabilizadas por ligação covalente multipontual (Figura 4) (GRAZÚ et al., 2010; LÓPEZ-GALLEGO et al., 2013; BEZERRA et al., 2015).

**Figura 4.** Efeito da imobilização covalente multipontual na estabilidade da enzima.

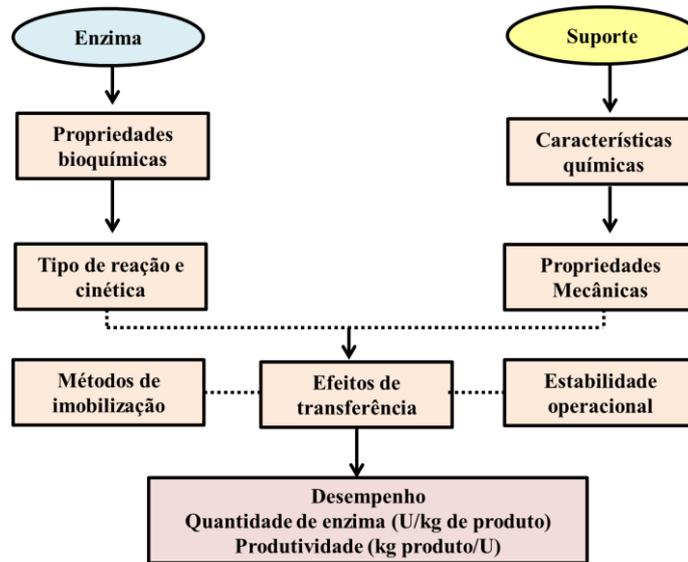


Fonte: Modificado de Mateo et al., 2007.

#### 1.4 Suportes para imobilização de enzimas

As preparações das enzimas imobilizadas são influenciadas pelas características da enzima e do material do suporte. A relação entre esses dois elementos proporciona um derivado estabilizado com propriedades químicas, bioquímicas, mecânicas e cinéticas específicas (Figura 5). Porém, a maior contribuição para o excelente funcionamento da enzima imobilizada é dada pelo suporte. Se, de um lado, um suporte criticamente selecionado pode elevar o tempo de meia-vida da enzima imobilizada, de outro, uma escolha errada pode afetar adversamente não só o tempo de meia-vida, porém o desempenho global do sistema. Na apuração de um suporte para uma determinada aplicação, devem ser consideradas suas propriedades físico-químicas bem como as relativas à perspectiva de renovação do material (BON; FERRARA; CORVO, 2008). Na Tabela 2 encontram-se descritas essas principais propriedades.

**Figura 5.** Relação entre suporte e enzima.



Fonte: BON; FERRARA; CORVO, 2008.

**Tabela 2.** Principais propriedades do suporte que influenciam o desempenho de um sistema de imobilização enzimático (BON; FERRARA; CORVO, 2008; VIEIRA, 2009).

<b>Estabilização mecânica e térmica</b>	O sistema enzimático de imobilização e o uso repetido e contínuo do derivado, normalmente implicam no uso de operações como filtração, centrifugação e agitação, logo, o suporte deve ter boa resistência mecânica. Outra propriedade fundamental é a estabilidade térmica do suporte, pois dependendo de seu coeficiente de expansão, pode sofrer distorção ou destruir o sítio ativo da enzima quando submetido a variações de temperatura.
<b>Características químicas</b>	Os suportes devem possuir grupos químicos que podem ser ativados ou modificados de modo a permitir a ligação da enzima sem desnaturá-la.
<b>Natureza hidrofílica</b>	A natureza hidrofílica do suporte é muito importante, pois suportes com características hidrofílicas são mais almejados de modo a se alcançar uma boa difusividade do substrato, além de permitir a estabilização da enzima. Os suportes de natureza hidrofóbica costumam abaixar a estabilidade e atividade da enzima em solventes orgânicos.
<b>Características morfológicas</b>	A morfologia do suporte é primordial, pois o mesmo deve ter elevada porosidade, o que permite ter uma grande área superficial interna para a imobilização da enzima, e poros com diâmetro satisfatório para permitir o simples acesso da enzima e do substrato.
<b>Resistência ao ataque microbiológico</b>	A resistência ao ataque microbiológico é fundamental, pois o mesmo deve resistir à degradação por micro-organismos, evitando a liberação da enzima para a solução.
<b>Insolubilidade</b>	A insolubilidade é uma característica crucial, não somente para prevenir a liberação da enzima do suporte, mas, sobretudo para se evitar a contaminação do produto pelo suporte dissolvido e pela enzima.
<b>Regenerabilidade</b>	A viabilidade de regeneração, bem como a reutilização da matriz, deve ser ponderada na avaliação econômica do sistema com enzima imobilizada.

Os suportes são classificados quanto à composição química em: orgânicos (naturais e sintéticos) e inorgânicos (minerais e manufaturados), como mostrado na Tabela 3.

**Tabela 3.** Classificação dos suportes quanto à composição química (ARROYO, 1998; VIEIRA, 2009).

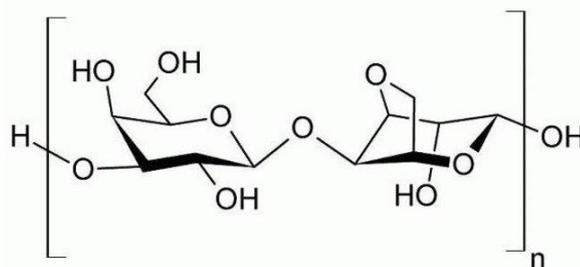
<b>Suportes orgânicos</b>	<b>Naturais</b>	Polissacarídeos: celulose, ágar, quitina, quitosana, amido, entre outros. Proteínas: colágeno, albumina, gelatina, glúten, seda, entre outros.
	<b>Sintéticos</b>	Poliestireno, poliacrilato, polivinílico, náilon, entre outros.
<b>Suportes inorgânicos</b>	<b>Minerais</b>	Areia, bentonita, herneblenda, pedra-pomes.
	<b>Manufaturados</b>	Vidro, cerâmica, aluminossilicatos, óxido de ferro, óxido de níquel, aço inoxidável, entre outros.

Segundo Vieira (2009), os suportes mais estudados e utilizados são: agarose, alginato, K-carragenina, celulose, quitina e quitosana. Neste trabalho, optou-se por estudar e utilizar o pó de sabugo de milho (resíduo lignocelulósico) para imobilização da alcalase®. A agarose também foi utilizada como suporte para imobilização da enzima para fins de comparação quanto aos parâmetros cinéticos de imobilização. Portanto, a seguir será feita a descrição destes dois suportes.

#### 1.4.1 Agarose

A agarose é um polímero natural extraído do ágar de algas vermelhas (Figura 6). Suas fibras são constituídas, essencialmente, de unidades repetidas de agarobiose (D-galactose e 3,6-anidro-L-galactose), cujas hidroxilas serão convertidas, por meio de reações químicas, em grupos ativos, onde se ligarão as enzimas a serem imobilizadas (GUISÁN et al., 1997).

**Figura 6.** Estrutura química básica da agarose, formada por repetidas unidades de agarobiose.

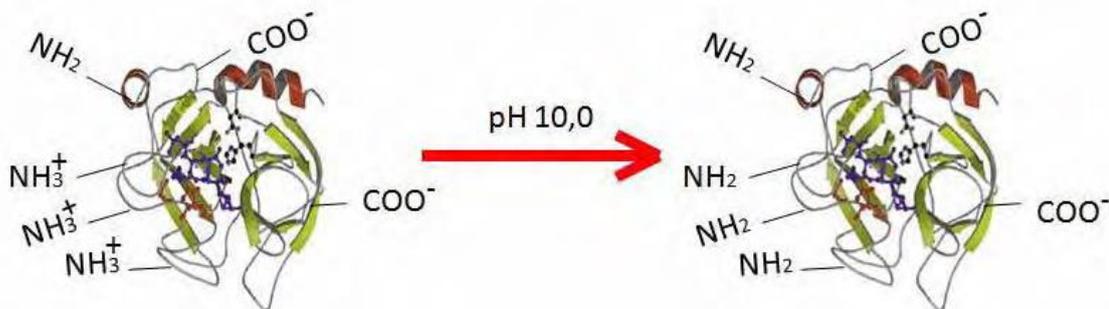


**Fonte:** <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/16500100>.

A agarose é muito utilizada como suporte para imobilização de enzimas, devido suas características físico-químicas. Além de ser atóxica e possuir alta porosidade, apresenta outros benefícios: caráter hidrofílico, facilidade de manuseio, ausência de grupos com cargas (o que previne a adsorção não específica do substrato e do produto) e disponibilidade comercial. No entanto, uma limitação do uso da agarose e demais suportes porosos é o custo elevado (RODRIGUES et al., 2008; ARAGON, 2013).

Os únicos grupos reativos presentes na agarose são o hidroxil. Desta forma, eles podem reagir com reagentes epóxidos para gerar grupos glioxil. O suporte glioxil-agarose (pequenos grupos aldeídos alifáticos) orienta a imobilização da enzima por meio de sua área de superfície que contem maior densidade de grupamentos amino, incluindo o amino-terminal da molécula e os grupamentos  $\epsilon$ -amino das cadeias laterais das lisinas. Em condições brandas de pH, no decorrer do processo de imobilização, são estabelecidas, preferivelmente, as ligações com os grupos amino-terminal, enquanto que condições de altos valores de pH (10,0-10,2) possibilitam que os grupamentos amino das lisinas estejam reativos (Figura 7) e se estabeleçam ligações entre esses resíduos de aminoácidos e o suporte (GUISÁN et al., 1997).

**Figura 7.** Desprotonação dos grupos  $\epsilon$ -amino das lisinas, após incubação em pH 10,0. Em pH 8,0-9,0, apenas o grupamento amino-terminal encontra-se reativo.



**FONTE:** ARAGON, 2013.

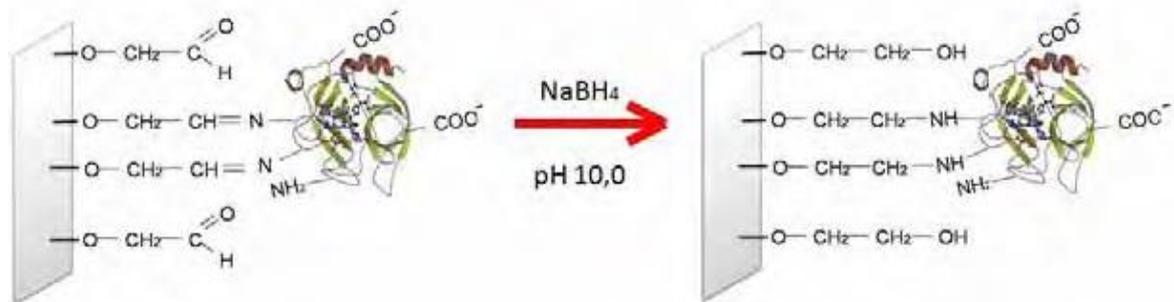
Suportes de glioxil têm sido descritos na literatura como um sistema bastante adequado para imobilização por ligação covalente multipontual (Figura 8) de diferentes enzimas e, especialmente da alcalase® (TARDIOLI et al., 2003; CORÍCI et al., 2011; PESSATO et al., 2016).

A matriz glioxil-agarose possui diversas propriedades que são convenientes para a realização de ligações covalentes multipontuais intensas. Dentre as quais, segundo Mateo et al. (2006), podem ser citadas:

- Reatividade muito elevada dos grupos glioxil com os grupos amino não-ionizados;

- Poucos impedimentos estéricos na reação entre os grupos aminos da proteína e os grupos glioxil do suporte;
- Boa congruência geométrica entre a proteína e a superfície do suporte;
- Fácil controle do grau de ativação;
- Braço espaçador curto que permite fixar a proteína na imobilização aumentando a rigidez da enzima;
- As ligações entre a enzima e o suporte são muito fracas, bases de Schiff. Isto significa que a energia necessária para a formação de cada ligação individual não pode compensar a energia necessária para produzir uma distorção da estrutura das proteínas, mantendo a funcionalidade da mesma;
- A redução final com o borohidreto de sódio transforma as fracas bases de Schiff em ligações amino secundária muito estável e todos os grupos aldeídos restantes do suporte sólido em grupos inertes. Esta é uma característica vantajosa deste suporte, pois os grupos não inertes da superfície do suporte podem promover interações não desejáveis enzima-suporte, promovendo uma diminuição da estabilidade ou até mesmo uma direta inativação da enzima.

**Figura 8.** Ilustração de uma enzima hipotética, imobilizada em glioxil-agarose. A redução com borohidreto de sódio torna irreversíveis as ligações imino formadas entre enzima e suporte.

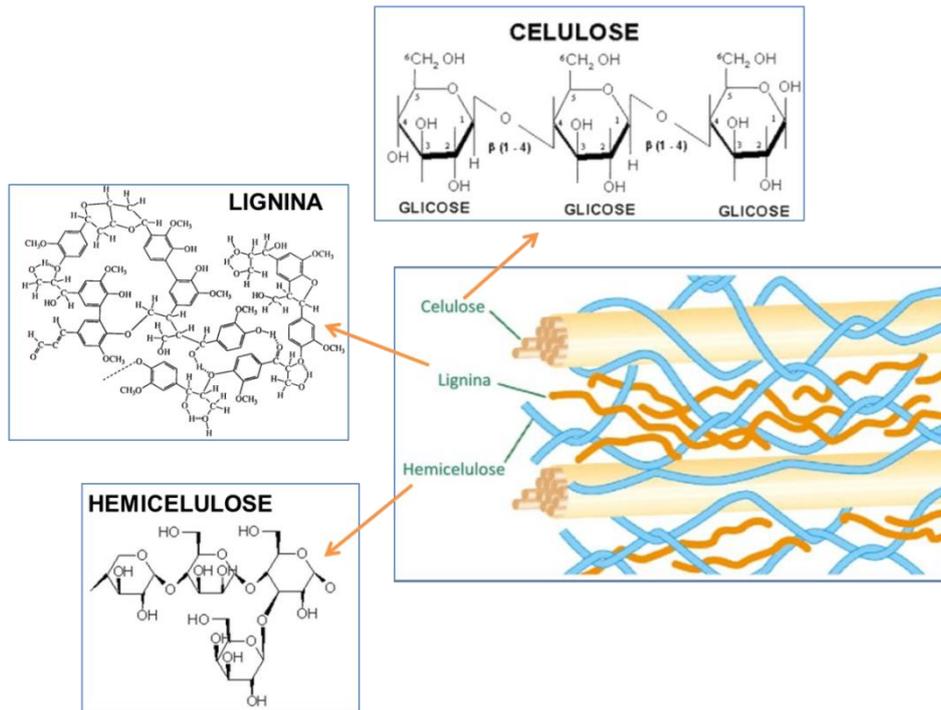


FONTE: ARAGON, 2013.

#### 1.4.2 Resíduos lignocelulósicos

Resíduos lignocelulósicos, agrícolas ou agroindustriais são materiais cuja parede celular vegetal apresenta estrutura química formada principalmente de: celulose (30-50%), hemicelulose (15-35%) e lignina (10-30%) (SANTOS, 2010) (Figura 9).

**Figura 9.** Parede celular de vegetais: composição química.



**Fonte:** Próprio autor.

Para a manutenção da qualidade do suporte e melhoria do processo de imobilização enzimática em resíduos lignocelulósicos, a aplicação de tratamentos químicos e/ou térmicos torna-se necessária. O tratamento resulta na ampliação da área superficial interna das partículas do substrato, realizada através da solubilização e/ou pela degradação parcial da hemicelulose e da lignina. Isto conduz ao fracionamento dos três principais componentes e leva à abertura da estrutura da celulose. O tratamento utilizado pode proporcionar melhoras significativas ao resíduo, podendo-se obter uma maior capacidade de imobilização ou até uma posterior hidrólise enzimática mais eficiente, devido ao aumento da porosidade, área superficial e do número de ligações químicas entre a enzima e o suporte (COSTA, 2015).

Os resíduos agroindustriais atualmente utilizados como suporte para imobilização de enzimas descritos na literatura encontram-se ilustrados na Tabela 4. Estes materiais podem ser uma alternativa de aplicação interessante já que existe em grande quantidade no Brasil, país essencialmente agroindustrial (SCATOLINO et al., 2013; COSTA, 2015). Além disso, os resíduos lignocelulósicos têm sido alvo de diversas pesquisas devido aos sérios problemas ambientais gerados pelo seu descarte indevido e acúmulo no ambiente (SCATOLINO et al., 2013; BEZERRA et al., 2015; COSTA-SILVA et al., 2015).

**Tabela 4.** Utilização de resíduos lignocelulósicos como suporte para a imobilização de enzimas: principais trabalhos encontrados na literatura.

<b>Enzima imobilizada</b>	<b>Suporte</b>	<b>Autores</b>
Invertase	Palha de milho	Monsan et al (1984)
Invertase	Serragem de madeira	Mahmoud (2007)
Invertase	Casca de arroz	D'Souza e Godbole (2002)
Lipase	Fibras de coco	Brígida et al (2008)
Lacase	Fibras de coco	Bezerra et al (2015)
Peroxidase	Pó de sabugo de milho	Galárraga et al (2013)
Tripsina e Pepsina	Pó de sabugo de milho	Bassan (2015)
Invertase	Bagaço de cana e sabugo de milho	Santos (2010)
Lipase	Fibras de coco	Brígida et al (2007)
Lipase	Sabugo de milho	Costa (2015)
Tripsina	Pó de sabugo de milho	Bassan et al (2016)

#### 1.4.2.1 Milho e sabugo de milho

A cultura do milho é uma das atividades agrícolas mais importantes do mundo. O Brasil é o terceiro maior produtor de milho e segundo a CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento), em setembro de 2015, a colheita brasileira de milho atingiu cerca de 85 milhões de toneladas. Adicionalmente, em 2021 o país deverá expandir sua área de cultivo para cerca de 500 mil hectares (SCATOLINO et al., 2013).

O sabugo de milho (SM) é o principal resíduo gerado da indústria de processamento de milho, após ser debulhado o grão. Estruturalmente, é formado por quatro partes diversas: palha fina, palha grossa, anel lenhoso e medula. A palha fina integra aproximadamente 4,1% do sabugo de milho em peso; a palha grossa 33,7%; o anel lenhoso 60,3% e a medula, 1,9%. Devido às características de dureza e resistência à abrasão, os componentes do sabugo são indicados em aplicações industriais. O pH da superfície granular do sabugo é 7,4, e no seu interior 4,9. Estes valores colaboram para que o sabugo sirva como suporte inerte para vários materiais (ZIGLIO et al., 2009; SANTOS, 2010).

O sabugo é amplamente utilizado para a produção de ração animal, alimentação bovina, bem como na confecção de feno e fertilizante orgânico. No âmbito industrial, devido às suas características de dureza e ainda por ser um material muito resistente, o sabugo tem sido utilizado como suporte e carga para vários materiais como plásticos, colas adesivos,

compostos de borracha, pneus, etc. Além disso, é utilizado como abrasivos e polidores em produtos de limpeza, produção de furfural, fabricação de tijolos e cerâmica. A depender do seu uso, muitas vezes, é necessário que o sabugo passe por um processo de secagem a fim de ser utilizado (COSTA, 2015).

São gerados aproximadamente 18 kg de sabugos a partir de 100 kg de milhos produzidos. Mesmo considerando todas as atribuições já destinadas ao SM, sua produção mundial é muito alta (800 milhões de toneladas) e a demanda para a sua utilização ainda é elevada (ZIGLIO et al., 2009; SCATOLINO et al., 2013).

Dentro deste contexto, a aplicação do pó de sabugo de milho como material suporte de baixo custo para imobilização de enzimas é uma alternativa de grande perspectiva para o reaproveitamento do SM que justifica o foco deste trabalho.

### 1.5 Reatores enzimáticos

A maior parte dos bioprocessos não possui relevância se não for aplicável em escala industrial. Portanto, é de considerável importância elevar a produção de laboratório para nível industrial. O biorreator é o principal equipamento que permite o aumento do volume de produção. Além disso, a utilização de enzimas imobilizadas em biorreatores melhora a qualidade do processo, pois além dos próprios benefícios provenientes da imobilização há também a facilidade de operação do reator que possibilita controlar as variáveis do sistema (EŞ; VIEIRA; AMARAL, 2015).

A produção de peptídeos bioativos a partir de matérias-primas ricas em proteínas pode ser escalonada a níveis industriais utilizando a hidrólise controlada em biorreatores (URISTA et al., 2011).

Reator ou biorreator enzimático é um dispositivo no interior do qual, transformações e reações bioquímicas são catalisadas por enzimas para geração de produtos específicos em condições controladas (SANTAELLA; CERRI; PAULA, 2017). Podem ser classificados em função do regime de operação (descontínuo ou contínuo) e das características hidrodinâmicas (reatores com agitação mecânica ou com escoamento tipo pistão). De acordo com o seu conteúdo podem ser homogêneos (única fase); ou heterogêneos (mais de uma fase). Quanto ao grau de mistura que ocorre no reator, têm-se dois tipos ideais extremos: o de mistura perfeita e o de escoamento tubular, sendo que o perfil de concentração dentro dos diferentes tipos de reatores pode variar apreciavelmente. Uma classificação dos reatores levando-se em

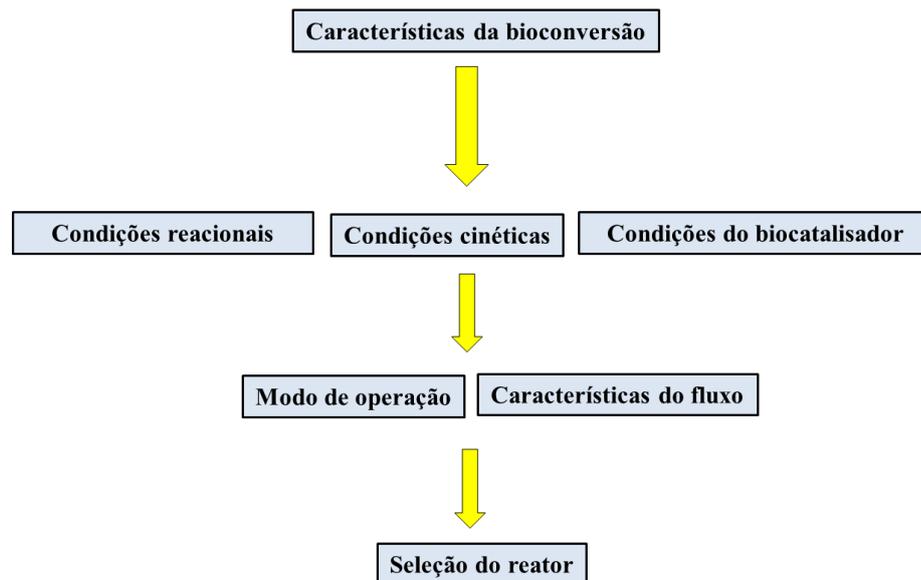
consideração o tipo de operação e as características hidrodinâmicas é apresentada na Tabela 5 (FERNANDES; FERREIRA; CABRAL, 2003; ZHANG; XING, 2011).

**Tabela 5.** Classificação dos reatores enzimáticos multifásicos em função do regime de operação e das características hidrodinâmicas (FERNANDES; FERREIRA; CABRAL, 2003).

<b>Modo de operação</b>	<b>Hidrodinâmica</b>	<b>Tipo de reator</b>
Descontínua	Mistura total	Reator descontínuo com agitação
	Fluxo tipo pistão	Reator descontínuo com recirculação total
Contínuo		Reator contínuo com agitação
	Mistura total	Reator contínuo com agitação e com membrana de ultrafiltração
		Reator de leito fixo
		Reator de leito fluidizado
	Fluxo tipo pistão	Reator tubular
		Reator de membranas de fibras ocas
		Reator agitado com uma fase líquida

O reator enzimático deve dar condições para que a enzima e o substrato permaneçam em contato por um tempo suficiente para que a reação ocorra e no final possibilite a fácil separação entre enzima e produtos. A escolha do reator mais adequado para um dado processo depende das características da bioconversão e de condições reacionais, cinéticas e ligadas ao biocatalisador, que irão definir o modo de operação e as características do fluxo (Figura 10).

**Figura 10.** Considerações importantes para a seleção de um biorreator.

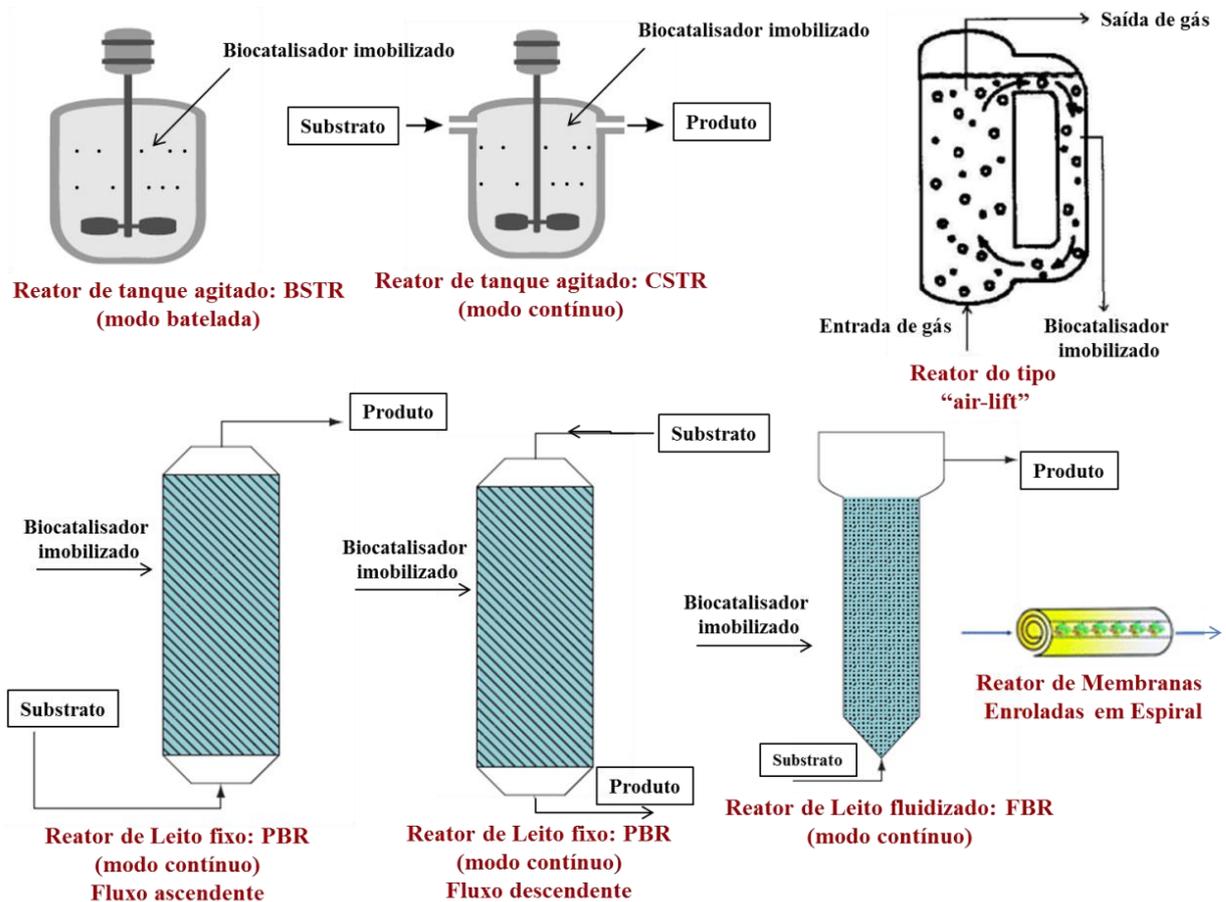


**Fonte:** Próprio autor modificado de Fernandes; Ferreira; Cabral, 2003.

### 1.5.1 Tipos de reatores enzimáticos

Diferentes tipos de reatores têm sido descritos para uso com enzimas imobilizadas: reator de tanque agitado, leito empacotado (ou de leito fixo), leito fluidizado, do tipo “air-lift” e de membranas (PAULA, 2011; EŞ; VIEIRA; AMARAL, 2015). Cada um deles apresenta vantagens e desvantagens, não havendo um método teórico capaz de presumir qual o preferível biorreator para um dado processo (PAULA, 2011), sendo os principais representados na Figura 11.

**Figura 11.** Biorreatores para biocatalisadores imobilizados.



**Fonte:** Próprio autor modificado de Paula, 2011; Caccavale et al., 2011; Zhang; Xing, 2011.

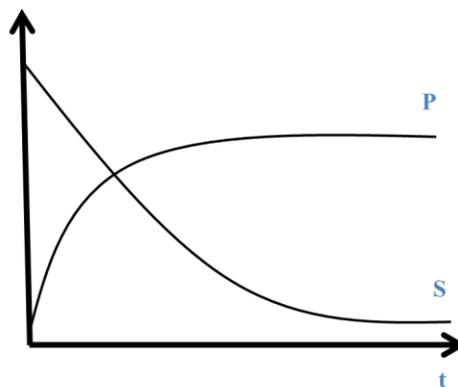
A seguir, são apresentadas as características de algumas configurações dos biorreatores utilizados no presente estudo.

#### 1.5.1.1 Reatores descontínuos

Reatores descontínuos, ou reator em batelada, são os mais utilizados com enzimas livres, os quais não são geralmente separados dos produtos nem recuperados para reutilizações posteriores. Esses tipos de reatores são inicialmente carregados com o substrato e a enzima, ocorrendo a reação em estado não estacionário, ou seja, com variação da composição do substrato e produto no reator ao longo do tempo. A concentração do substrato diminui ao longo do tempo, enquanto que a concentração de produto e a conversão aumentam (Figura 12). Geralmente são utilizados tanques agitados como reatores descontínuos (FERNANDES; FERREIRA; CABRAL, 2003).

Reatores de tanque agitado (STR) são os mais empregados em processos industriais e processos em que os biocatalisadores são imobilizados em hidrogéis ou em superfícies sólidas porosas. Neste tipo de reator, o agitador desempenha várias funções: auxilia a transferência de massa e de calor, agita e homogeniza o meio e as suspensões. STR são constituídos de um vaso (Figura 11) no qual a mistura dos reagentes é efetuada por meio de agitação mecânica (barras magnéticas, pás de agitação) de tal forma que são evitados a formação de gradientes de temperatura e concentração. Podem ser operados em modo descontínuo (BSTR) ou contínuo (CSTR) (PAULA, 2011).

**Figura 12.** Reator descontínuo de mistura total: perfil de concentração de substrato (S) e de produto (P).



**Fonte:** Fernandes; Ferreira; Cabral, 2003.

Quando as enzimas imobilizadas são utilizadas num reator descontínuo com agitação, estas devem ser separadas do produto numa etapa subsequente. Os processos de recuperação, por filtração ou centrifugação, geralmente provocam perdas de partículas de catalisador, bem como a desativação parcial da enzima imobilizada. Ainda neste tipo, alguns suportes sofrem cisalhamento devido ao atrito com o agitador (FERNANDES; FERREIRA; CABRAL, 2003).

No modo de operação em batelada, a enzima e as moléculas de substrato têm tempos de residência idênticos dentro do reator. No caso ideal, os reatores em batelada têm uma fase contínua homogênea; a fase líquida é bem misturada e de temperatura e composição uniformes. Não há variações espaciais nas concentrações dos reagentes ou dos produtos. O modo de operação em batelada para reatores enzimáticos tem uma série de características vantajosas: (1) simplicidade e flexibilidade do processo; (2) boa transferência de calor e massa no meio de reação; (3) facilidade de controle de pH e temperatura. No entanto, as desvantagens do modo em batelada são: (1) custos de operação superiores aos de processos contínuos devido ao tempo necessário para enchimento, aquecimento, esterilização, resfriamento, esvaziamento e limpeza do reator; (2) variação da qualidade do produto de uma batelada à outra; (3) tempo morto entre as bateladas; (4) possibilidade de perder a enzima imobilizada durante sua recuperação entre as bateladas (ZHANG; XING, 2011).

#### 1.5.1.2 Reatores contínuos

Nos reatores contínuos, o substrato é alimentado, enquanto a solução da reação é removida para manter o volume reacional constante. Desta forma, o substrato entra numa extremidade da zona de reação e o produto é liberado pela extremidade contrária (ZHANG; XING, 2011).

Os reatores de leito fixo ou reatores de leito empacotado (PBR) são os mais utilizados em processos contínuos com enzimas imobilizadas (ZHANG; XING, 2011; EŞ; VIEIRA; AMARAL, 2015). PBR tem um design muito simples (Figura 11) que consiste de uma coluna recheada com partículas de enzima imobilizada, através da qual uma solução reagente é bombeada (EŞ; VIEIRA; AMARAL, 2015; LORENZONI et al., 2015).

PBR exhibe vantagens como controle automático de operação, redução dos custos com mão de obra, facilidade de construção e operação, alta produtividade volumétrica, controle da qualidade do produto final que é continuamente recolhido. Além disso, um sistema PBR é mais rentável do que a operação utilizando reator em batelada, pois a fácil automação e controle do sistema permite uma maior produtividade, bem como uma melhoria na

estabilidade enzimática (BENUCCI et al., 2016). Quanto às desvantagens, há a dificuldade de controle de pH e temperatura por todo meio de reação, controle da pressão interna e possibilidade de formação de caminhos preferenciais pelo leito (ZHANG E XING, 2011; ARAGON et al., 2013; BASSAN, 2015). Ademais, quando suportes de imobilização apresentam dimensões muito pequenas (por exemplo: diâmetro inferior a 300  $\mu\text{m}$ ), não podem ser empregados em reatores de leito fixo, já que a perda de carga ao longo do reator é muito grande e, particularmente quando se opera em fluxo descendente, pode haver a compactação do leito (PAULA, 2011).

Num reator ideal do tipo PBR há um fluxo ordenado de substrato por meio do leito de enzima imobilizada numa direção escolhida (ascendente ou descendente) (Figura 11), em que nenhum elemento de fluido se mistura com um elemento anterior ou posterior. Nesta situação ideal, o reator opera como um reator tipo tubular onde todos os elementos de fluido dentro do reator apresentam igual tempo de residência. Na prática, é muito complicado conseguir-se um reator ideal tipo tubular devido a diversos fatores, tais como: gradientes radiais de temperatura, velocidade e dispersão axial do substrato. Estes efeitos de fluxo não ideal conduzem a uma redução do grau de conversão. Apesar das limitações, o reator de leito fixo ainda é o mais estudado e utilizado desde a escala de laboratório até a industrial (FERNANDES; FERREIRA; CABRAL, 2003).

## **1.6 Peptídeos bioativos**

Desde 1979, diversos grupos têm estudado peptídeos bioativos do soro do leite e derivados que apresentam diversas funções no organismo, dentre as quais, podem ser citadas as antioxidantes, antimicrobianas, anti-hipertensivas, dentre outras (Tabela 6). Desta forma, o consumo de alimentos ricos em peptídeos bioativos pode exercer um grande impacto na saúde humana como a prevenção de infecções e doenças (KORHONEN; PIHLANTO, 2006; NAGPAL et al., 2011; RUTHERFURD-MARKWICK, 2012; GOBBA et al., 2014).

**Tabela 6.** Peptídeos bioativos derivados das proteínas do soro de leite.

<b>Proteína precursora</b>	<b>Bioatividade</b>	<b>Enzima livre</b>	<b>Referência</b>
Proteínas do soro	Anti-hipertensiva	Papaína e pancreatina	Silvestre et al. (2012)
Proteínas do soro	Antioxidante	Alcalase®	Tang et al. (2009)
$\beta$ -Lg	Anti-hipertensiva	N-proteinase	Ortiz et al. (2009)
$\alpha$ -La Bovina	Antioxidante	Termolisina	Sadat et al. (2011)
Proteínas do soro	Antioxidante	Alcalase®	Zhang et al. (2010)
Lactoferrina do soro	Antimicrobiana	Pepsina	Gobbetti et al. (2002)
Proteínas do soro	Antimicrobiana	Pepsina	Théolier et al. (2013)
$\beta$ -Lg e $\alpha$ -La	Antibacteriana	Tripsina e quimotripsina	Pellegrini et al. (2001)

Como visto na Tabela 6, a hidrólise enzimática é capaz de produzir peptídeos com diversas atividades biológicas. A obtenção destes compostos requer purificação e identificação, pontos cruciais para a viabilidade do processo e caracterização dos produtos. A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (RP-HPLC) e a espectrometria de massas (MS) são as mais comumente técnicas utilizadas para fracionar e identificar peptídeos (KORHONEN, 2009; URISTA et al., 2011).

Sabe-se que a peroxidação lipídica é capaz de gerar radicais livres e levar a decomposição de ácidos graxos, reduzindo o valor nutricional e a segurança dos alimentos. Além disso, reações que envolvem formação de radicais livres têm uma elevada importância em fenômenos biológicos, como nos danos celulares e envelhecimento. Os radicais livres podem também modificar a estrutura do DNA, proteínas, pequenas moléculas celulares e acredita-se desempenhar um papel significativo na ocorrência de doenças, tais como as cardiovasculares, *diabetes mellitus*, distúrbios neurológicos e até mesmo doença de Alzheimer (KIM et al., 2007; Ruiz-Ruiz et al., 2013; MANN et al., 2015).

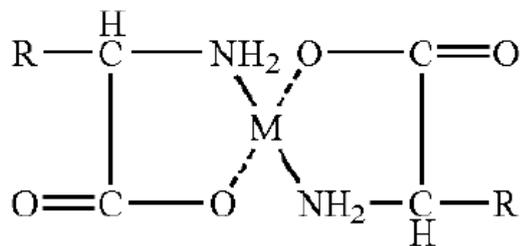
O uso de antioxidantes sintéticos como butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), terc-butilhidroquinona (TBHQ) e propil galato (PG) tem sido restringido devido ao potencial efeito tóxico em humanos (ZHANG et al., 2010). Desta forma, peptídeos antioxidantes naturais, como os provenientes das proteínas do soro, têm despertado grande interesse devido à segurança e grande disponibilidade no ambiente.

As proteínas do leite também são precursoras de peptídeos antibacterianos e, desta maneira podem melhorar as defesas naturais do organismo contra a invasão de micro-organismos patogênicos. Portanto, as soroproteínas podem ser consideradas componentes estruturais da imunidade. A atividade antimicrobiana pode ser benéfica durante o processo de produção, diminuindo possivelmente a contaminação de alimentos lácteos e consequentemente proporcionando elevação na vida útil do produto (PELLEGRINI, 2003; THÉOLIER et al., 2013; RIPOLLES et al., 2015).

Com o intuito de elevar a absorção de ferro mediante suplementação, têm-se estudado quelatos ferro-peptídeos, obtidos de diversas fontes proteicas. A obtenção de peptídeos quelantes de ferro a partir de hidrolisados proteicos pode ser útil no aumento da biodisponibilidade do mineral, enquanto sua estabilidade mantém a qualidade e aparência do alimento. As proteínas de soro de leite representam uma fonte interessante para obtenção de peptídeos quelantes de ferro, pois possuem elevado valor biológico, alta digestibilidade e rápida absorção pelo organismo (KIM et al., 2007; SILVA, 2013; GOBBA et al., 2014).

A palavra quelato é originária do grego “chele”, da qual a tradução é pinça ou garra. A estrutura dos quelatos é resultado do compartilhamento de elétrons entre um metal e um ligante (Figura 13). Aminoácidos e pequenos peptídeos provenientes da hidrólise enzimática de proteínas são ligantes ideais, pois em um ambiente aquoso, encontram-se no estado zwitteriônico, com o grupo carboxílico e amino ionizados de cargas opostas e, portanto, ambos os grupos podem participar da reação de quelação com o íon de metal (DEWAYNE ASHMEAD, 2001; LIMA, 2011; SILVA, 2013).

**Figura 13.** Representação da ligação entre um quelante e metal.



**FONTE:** SILVA, 2013.

A produção de peptídeos bioativos a partir da hidrólise enzimática de proteínas presentes no soro de queijo tem sido reportada em diversos trabalhos, inclusive utilizando a alcalase® livre como visto na Tabela 6. No entanto, há uma demanda de estudos que implicam na produção contínua destes compostos por enzimas imobilizadas e, especialmente, usando material lignocelulósico como suporte de baixo custo.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Hidrólise das proteínas do soro do queijo bovino utilizando a alcalase® imobilizada em pó de sabugo de milho, para obtenção, purificação parcial e avaliação da atividade biológica dos peptídeos bioativos.

### 2.2 Objetivos específicos

1. Ativação dos suportes pó de sabugo de milho e agarose a grupo glioxil;
2. Imobilização da enzima alcalase® em SM e agarose;
3. Caracterização cinética da alcalase® livre (AL) e dos derivados: alcalase®-glioxil-agarose (AGA) e alcalase®-glioxil-SM (AGSM);
4. Hidrólise enzimática das proteínas do soro de queijo com o derivado AGSM utilizando sistema descontínuo: reator em batelada (RB);
5. Hidrólise enzimática das proteínas do soro de queijo com o derivado AGSM utilizando sistema contínuo: reator de leito empacotado (PBR);
6. Caracterização e quantificação dos hidrolisados proteicos (HP) obtidos;
7. Fracionamento dos hidrolisados obtidos por AGSM utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (RP-HPLC);
8. Determinação da massa molecular dos peptídeos formados por meio da análise MALDI-TOF;
9. Avaliação das seguintes atividades biológicas dos peptídeos obtidos na hidrólise: antioxidante, quelante de metais e antimicrobiana.

## 3. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Material

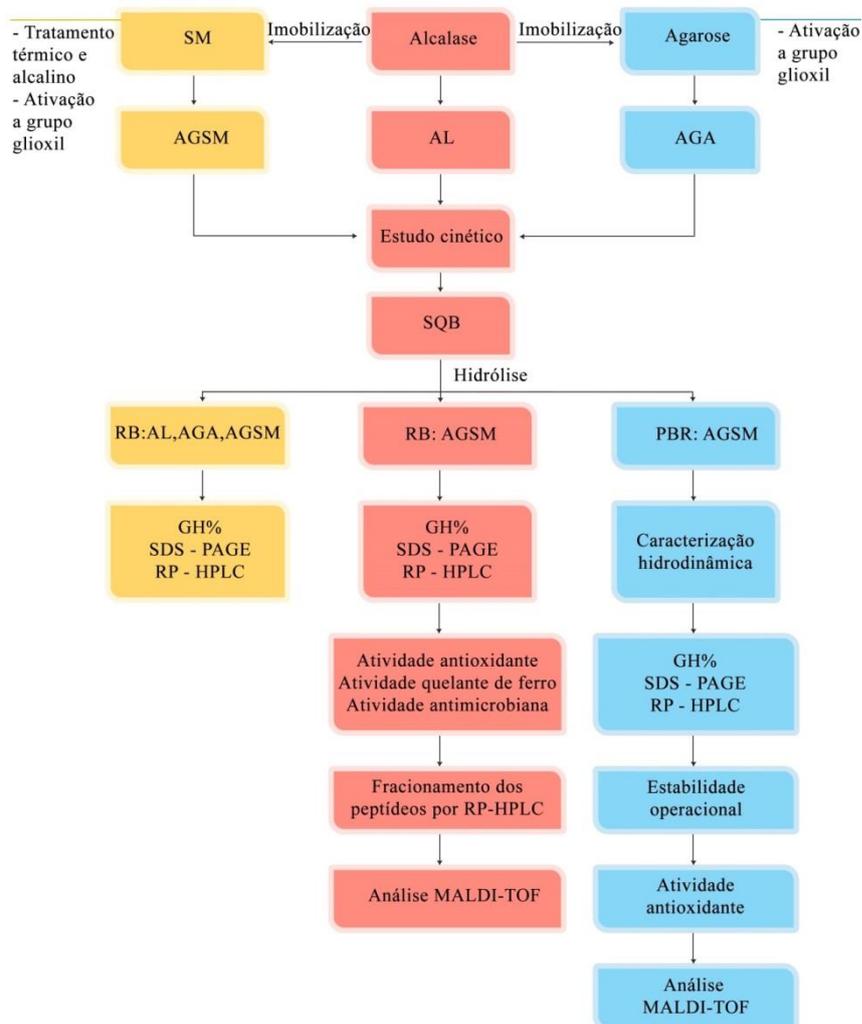
Os reagentes ABTS (2,2-azinobis-[3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfônico]), trolox (ácido 6- hidróxi-2-5-7-8 tetrametilcromo 2-carboxílico), glicidol, glutaraldeído, reagente de Bradford, boc-Ala-ONp (éster-paranitrofenílico de N-butiloxicarbonil-L-alanina), TNBS (ácido trinitrobenzeno sulfônico), ferrozina, FeCl<sub>2</sub> (cloreto de ferro II), NaIO<sub>4</sub> (periodato de

sódio) foram adquiridos da Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA). Junto a Merck (Merck, Brazil) foram adquiridos a enzima alcalase® (EC 3.4.21.62) e o NaBH<sub>4</sub> (borohidreto de sódio). Agarose 6 BCL (Cross linked 6 Beads) foi obtida da GE Healthcare Bio-Sciences (Uppsala, Sweden) e o sabugo de milho da SAGRAN (Industry of Animal Feed Ingredients Ltd., Salto Grande, Brazil). Os demais reagentes foram todos de grau analítico.

### 3.2 Métodos

Para uma melhor visualização das etapas do presente trabalho é apresentado a seguir um fluxograma esquemático simplificado (Figura 14).

**Figura 14.** Fluxograma das etapas realizadas no presente trabalho. **SM**= sabugo de milho. **AGSM**= derivado alcalase®-glioil-SM. **AL**= alcalase® livre. **AGA**= derivado alcalase®-glioil-agarose. **SQB**= soro de queijo bovino. **RB**= reator em batelada. **PBR**= reator de leito empacotado. **GH**= grau de hidrólise (%).



### 3.3 Preparo do soro de queijo bovino

O soro de queijo bovino (SQB) foi preparado pela adição de 0,6% (v/v) de renina de *A. niger* e 0,5% (v/v) 0,5 mol. L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub> ao leite integral bovino a 35°C durante 1 h. Após precipitação de caseína, o soro foi filtrado em gaze (GOULART et al., 2014) e dialisado em membrana de celulose (12 kDa, Sigma) a 8°C para remoção de lactose (MCPHIE, 1971). A gordura foi removida por adsorção em caulin (20 g. L<sup>-1</sup> m/v), com subsequente centrifugação a 7400 x g a 4°C durante 30 min. O soro tratado foi armazenado a -18 ° C (BASSAN et al., 2015).

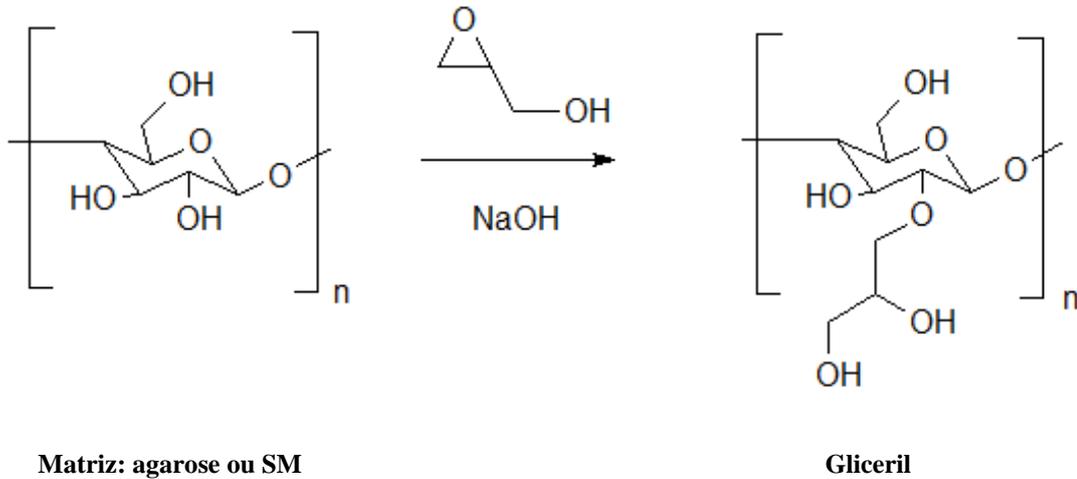
### 3.4 Tratamento do suporte pó de sabugo de milho

O pó de sabugo de milho foi tratado com álcool 70% (1:10 m/v) submetido à descompressão térmica, por meio de autoclave 121°C (1,3 Kgf/cm<sup>2</sup>), por 20 minutos visando expandir os materiais lignocelulósicos e aumentar a superfície de contato. Posteriormente, o SM foi mantido sob agitação de 140 rpm por 24 horas em NaOH 2M para quebra e remoção da lignina, lavado com água abundante e filtrado a vácuo. O SM tratado foi armazenado até o momento da ativação e imobilização em solução de álcool 20% a 8°C, com o intuito de evitar contaminação biológica do material (BASSAN et al., 2016).

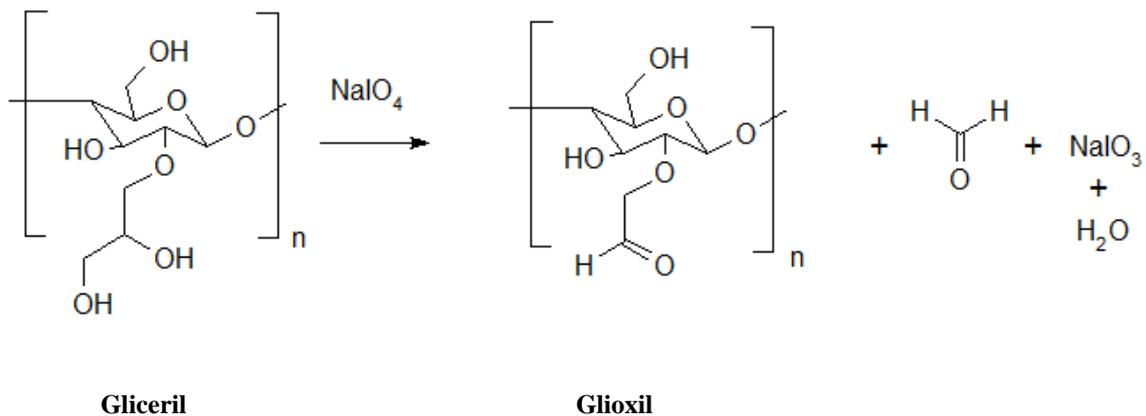
### 3.5 Ativação dos suportes agarose e pó de sabugo de milho

Foram utilizados os suportes agarose 6 BCL e pó de sabugo de milho. A metodologia de ativação da agarose foi feita segundo Guisán (1988) (Figura 15 e 16). Para a ativação do pó de sabugo de milho, a mesma metodologia foi adaptada da seguinte forma: 32 g de SM foi suspenso em 45,7 mL de água ultrapura, seguido da adição de 76,15 mL de NaOH 1,7 M contendo 2,17 g de NaBH<sub>4</sub>. A mistura foi colocada num banho de gelo e 11 mL de glicidol foram adicionados sob agitação por 18 h a 25°C. Após filtração, o suporte foi lavado com 10 volumes de água. Gliceril-SM (32 g) foram ativados a grupos glioxil pela adição de 64 mL de NaIO<sub>4</sub> 100 mM e 256 mL de água ultrapura. A mistura foi agitada durante 2 h, e o suporte foi lavado com água.

**Figura 15.** Reação simplificada de formação de grupos gliceril na celulose a partir da adição de glicidol e hidróxido de sódio.



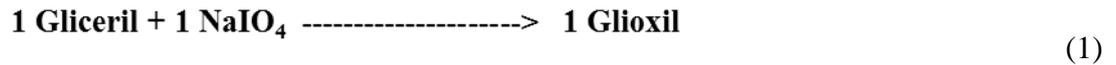
**Figura 16.** Reação simplificada de formação de grupos glioxil a partir da oxidação com periodato de sódio.



Fonte: Guisán (1988).

### 3.6 Quantificação de grupos aldeídos

Os grupos aldeídos formados pela reação dos suportes contendo grupos gliceril e  $\text{NaIO}_4$  100 mM foram quantificados por titulação com iodeto de potássio 10% (KI) como descrito por Nevell (1963). O número de grupos glioxil foi calculado pela diferença no consumo de periodato de sódio no momento de sua adição ao suporte gliceril e ao final dos 90 minutos. Por se tratar de uma reação estequiométrica, ao final do processo de oxidação é possível determinar a quantidade de grupos glioxil formados. A equação (1) ilustra a reação:



### 3.7 Imobilização: preparo dos derivados AGA e AGSM

Para a imobilização, 1 grama de ambos suportes foram adicionados a 10 mL de tampão carbonato/bicarbonato de sódio 100 mM pH 10 contendo 10 U de alcalase® para o AGA e 22 U de alcalase® para o AGSM. As suspensões foram mantidas a 25° C, sob agitação suave. Periodicamente, as atividades do sobrenadante, do controle e da suspensão foram determinadas para acompanhar o rendimento de imobilização. Ao final do processo de imobilização foi adicionado NaBH<sub>4</sub> (1mg/1mL) para redução dos grupos ativos remanescentes. O derivado foi então filtrado e lavado com água destilada (GUISÁN, 2006). O rendimento de imobilização (RI) foi definido como a relação entre as atividades no sobrenadante e no controle da enzima livre (equação 2), e a atividade recuperada (AR) foi dada pela razão entre a atividade da suspensão final, após o processo de imobilização e a atividade inicial da enzima oferecida (equação 3):

$$RI (\%) = \frac{A-B}{A} \times 100 \quad (2)$$

onde A é a atividade enzimática da solução utilizada para a imobilização (controle), e B é a atividade verificada no sobrenadante.

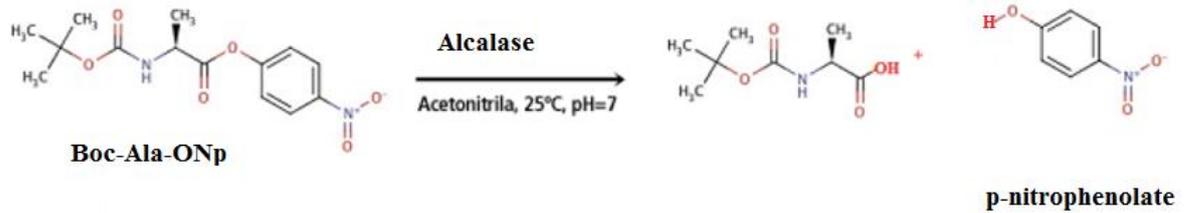
$$AR (\%) = \frac{C}{A} \times 100 \quad (3)$$

onde A é a atividade enzimática da solução utilizada para a imobilização (controle), e C é a atividade do derivado obtido após imobilização.

### 3.8 Ensaio de atividade enzimática

A atividade enzimática da alcalase® livre (diluída 2000 vezes em água ultrapura) e imobilizada foi determinada de acordo com Tardioli et al. (2003). O coeficiente de absorvidade molar ( $\epsilon$ ) do p-nitrofenol foi de 6609,3 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>, (APÊNDICE A) onde uma unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que hidrolisa 1  $\mu$ mol de boc-Ala-ONp por minuto nas condições de ensaio.

**Figura 17.** Hidrólise do substrato sintético boc-Ala-ONp utilizando a enzima alcalase®.



Fonte: próprio autor.

### 3.9 Caracterização cinética da enzima livre e dos derivados

**3.9.1 Parâmetros cinéticos:** Os valores da constante de afinidade ( $K_m$  aparente) e velocidade máxima ( $V_{max}$  aparente) da alcalase® foram determinados pelo método gráfico de Eadie-Hofstee (APÊNDICE B).

**3.9.2 pH ótimo:** Para a determinação do pH de melhor atividade, as enzimas foram incubadas em sistemas tamponantes, com pH ajustado entre 3,0 e 10 na temperatura ótima da alcalase® de 50° C (APÊNDICE C).

**3.9.3 Estabilidade térmica:** A alcalase® livre e os derivados foram incubados em tampão fosfato (100 mM), pH 7,0 a 65° C. Em determinados tempos, uma amostra foi retirada, e a atividade enzimática, determinada, conforme descrito em 3.8. O tempo de meia vida da enzima foi definido como o momento em que a enzima apresenta apenas 50% de sua atividade inicial. O fator de estabilização foi definido pela razão entre o tempo de meia-vida do derivado em questão e o da alcalase® livre.

**3.9.4 Reuso:** Os derivados AGA e AGSM foram submetidos a 5 ciclos de reuso. Para cada ciclo foram utilizados 20 mL de soro (pH 9,0) e 1,0 g de derivado. A suspensão foi mantida a 50°C e 100 rpm/24 h. No final de cada ciclo de reuso, o produto foi retirado por filtração à vácuo e um novo substrato adicionado. A atividade foi monitorada pelo método de Sarath, Motte and Wagner (1996) através da precipitação das proteínas com TCA 10% e a absorbância ( $\lambda = 280$  nm) do sobrenadante foi utilizada para os cálculos. Foi construída uma curva analítica da tirosina e utilizado o  $\epsilon = 1232,7 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (APÊNDICE D). Para estimar a atividade relativa de cada ciclo, a atividade inicial foi considerada 100% (PESSATO et al., 2016).

### 3.10 Hidrólise enzimática das proteínas do soro de queijo bovino

A hidrólise enzimática das proteínas do soro de queijo bovino neste presente estudo foi realizada por reatores operando em modo batelada e contínuo: RB (sistema descontínuo) e PBR (sistema contínuo).

#### 3.10.1 Reator em batelada (RB)

A hidrólise das proteínas do SQB em sistema descontínuo foi feita utilizando AL (0,5 mL; 8,23 U/mL), e os derivados AGA (0,5 g; 13,8 U/g) e AGSM (0,5 g; 9,54 U/g). Para cada ensaio foram utilizados 20 ml de soro de queijo tratado (pH 9,0; 50°C/48h). A mistura foi mantida a 100 rpm (shaker Innova 40) em frasco erlenmeyer de 125 mL. Nos tempos de 3, 6, 12, 24 e 48 h foram retiradas alíquotas para dosagem de atividade. Terminada a reação, o hidrolisado contendo a AL foi fervido a 100°C para a inativação da enzima, já os derivados foram filtrados à vácuo, lavados com água destilada e estocados para reuso a 8°C em solução tampão fosfato 0,1 mM pH= 7,0 contendo 0,02% (w/v) de azida sódica. O sobrenadante foi congelado a -18°C e posteriormente submetido a liofilização para demais análises.

#### 3.10.2 Reator de leite empacotado (PBR)

Na Figura 18 apresenta-se um esquema ilustrativo do sistema PBR utilizado neste trabalho. O meio de reação (soro de queijo bovino) foi armazenado no tanque SQB e o produto hidrolisado coletado no tanque HP; ambos os reservatórios foram mantidos sob refrigeração. O meio foi bombeado por meio de uma bomba peristáltica para dentro do reator de vidro encamisado (diâmetro interno de 2 cm e altura de 22,5 cm) com volume útil de 65 mL. A temperatura de reação foi 50°C e a umidade do suporte foi de 79,45%. A vazão de alimentação e a massa total do biocatalisador foram, respectivamente, 6mL.h<sup>-1</sup> e 25 g de AGSM (densidade cristalina do biocatalisador: 0,89 g mL<sup>-1</sup>). Os parâmetros umidade do suporte, vazão, massa e densidade cristalina foram determinados experimentalmente. Amostras periódicas de produtos hidrolisados foram coletadas para a análise.

### 3.10.2.1 Caracterização hidrodinâmica do PBR

Visando-se à caracterização hidrodinâmica do reator de leito empacotado, operando em modo contínuo, realizou-se o teste de traçador. O tempo espacial ( $\tau$ ), ou teórico, foi determinado através da divisão do volume útil pela vazão de alimentação.

Inicialmente o leito foi preenchido com 25 g de SM. Em seguida, o sistema foi operado, sob vazão de alimentação de 6 mL.h<sup>-1</sup> de soro, o que correspondeu a 10,8 h de tempo espacial. O corante vermelho de fenol (0,6 g.L<sup>-1</sup>) foi solubilizado em água ultrapura e utilizado como traçador (Curva analítica: Absorbância = 66,942\*Concentração + 0,002; R<sup>2</sup> = 0,9993, concentração de vermelho de fenol em g.L<sup>-1</sup>) (APÊNDICE E).

Realizou-se o experimento de entrada de pulso e a distribuição do tempo de residência (DTR) foi determinada pela injeção do traçador no reator no tempo zero. A concentração do traçador (C, a 431 nm) na corrente de efluente foi quantificada por espectrofotometria (Espectrofotômetro Varian Cary 50 UV/Vis, Varian Australia Pty Ltd, Mulgrave, VIC, Austrália) em função do tempo. A função de distribuição de tempo de residência, E (t), foi definida usando a Equação 4 (FOGLER, 2009):

$$E(t) = \frac{C(t)}{\int_0^{\infty} C(t)dt} \quad (4)$$

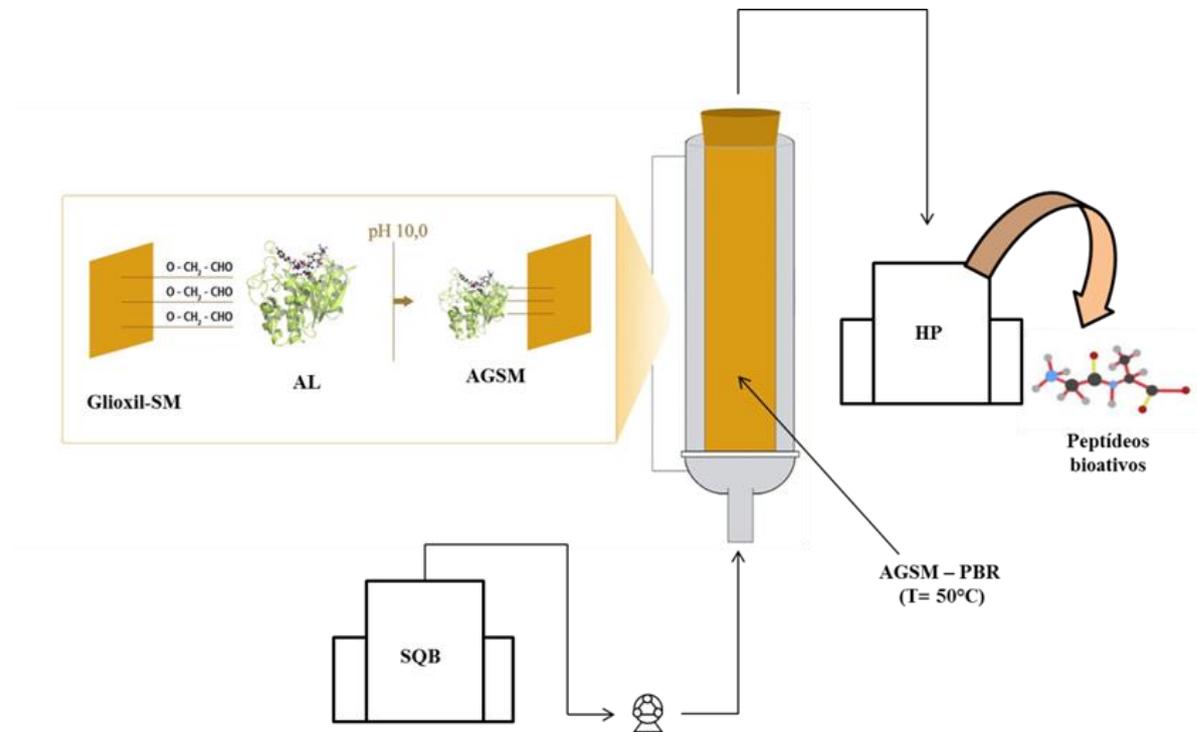
onde C (t) é a concentração do marcador no tempo t.

O tempo médio de residência ( $t_m$ ), ou prático, para um fluxo volumétrico constante, foi calculado utilizando a Equação 5 (FOGLER, 2009):

$$t_m = \int_0^{\infty} t.E(t)dt \quad (5)$$

A integração na equação 5, foi realizada empregando-se o software ORIGIN 7.0 (OriginLab Corporation, MA, EUA).

**Figura 18.** Fluxograma simplificado da configuração correspondente ao PBR para a hidrólise das proteínas do soro de queijo em sistema contínuo utilizando o derivado AGSM. Utilizou-se reator de vidro encamisado PBR (diâmetro interno= 2 cm e h= 22,5 cm; volume útil= 65 mL; T= 50°C; vazão= 6mL.h<sup>-1</sup>; massa= 25 g de AGSM). **AL**= alcalase® livre; **AGSM**= derivado alcalase® glioxil-SM; **HP**= hidrolisado proteico; **SQB**= soro de queijo bovino.



### 3.10.2.2 Estabilidade operacional

A Equação 6 foi usada para descrever a diminuição do grau de hidrólise após o estado estacionário. Os valores do grau de hidrólise foram linearizados de acordo com a Equação 7:

$$GH = GH_0 \cdot e^{-K_d \cdot t} \quad (6)$$

$$\ln(GH_t / GH_0) = -K_d \cdot t \quad (7)$$

O tempo de meia-vida do biocatalisador ( $t_{1/2}$ ) foi estimado pela Equação 8:

$$t_{1/2} = \ln(2) / K_d \quad (8)$$

em que: GH= grau de hidrólise;  $GH_0$  = valor médio de GH durante o estado estacionário; Kd = constante de desativação térmica; t= tempo;  $GH_t$  = grau de hidrólise em dado tempo.

### 3.11 Caracterização e quantificação do soro e hidrolisados

3.11.1 Determinação de lactose: Para a dosagem de açúcar redutor utilizou-se o método de Miller (1959). Foi construída uma curva analítica de lactose e obtido o  $\epsilon = 152,36 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (APÊNDICE F).

3.11.2 Determinação de proteínas: foi realizada pelo método de Bradford (1976). Para os cálculos, foi construída uma curva analítica da soroalbumina (SBA) e determinado o  $\epsilon = 2,48 \text{ (mg/mL)}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (APÊNDICE G).

3.11.3 Grau de hidrólise (GH): foi determinado pelo método TNBS modificado de Spadaro et al. (1979) e Spellman et al. (2003). O grau de hidrólise foi calculado usando a Equação 9:

$$GH (\%) = (AN_2 - AN_1) * 100 / N_{pb} \quad (9)$$

O teor de nitrogênio das ligações peptídicas no soro ( $N_{pb}$ ) foi  $123,3 \text{ mg.g}^{-1}$ . O valor de AN foi obtido usando a Equação 10:

$$AN = ABS / mP \quad (10)$$

em que: ABS= absorvância da amostra, m= coeficiente angular da L-Leucina em  $\text{mg.L}^{-1}$  obtido pela curva analítica da leucina e P= concentração de proteína da amostra ( $\text{g.L}^{-1}$ ). Obteve-se  $m = 0,0034 \text{ (mg/L)}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (APÊNDICE H).

3.11.4 SDS-PAGE 12%: Foi feita a eletroforese desnaturante segundo Laemmli (1970). Utilizou-se como padrão de massa molar o kit GELifesciences® composto por fosforilase B (97 kDa), BSA (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (31 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e  $\alpha$ -lactoalbumina (14,4 kDa). As condições de corrida foram de 200 V e 20 mA (BASSAN, 2015). Após a eletroforese, os géis foram revelados com Comassie Blue R 250 (Sigma) (MARQUES, 2005).

3.11.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (RP-HPLC): Utilizou-se RP-HPLC em modo analítico em um cromatógrafo Shimadzu LC-10A/C-47A. Foi empregada uma coluna de fase reversa Júpiter Phenomenex C18 (150 x 4,60 mm, tamanho de partícula de 3,6  $\mu\text{m}$ , tamanho de poro de 200  $\text{\AA}$ ), com um gradiente linear de 5 a 95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 minutos, fluxo de 1,0 mL/min e detecção a 220 nm.

### **3.12 Fracionamento dos peptídeos por RP-HPLC**

O fracionamento dos peptídeos foi feito em modo semi-preparativo, utilizando cromatógrafo Beckman System Gold equipado com uma coluna de fase reversa Júpiter Phenomenex C18 (250 x 10 mm; 15  $\mu\text{m}$ ; 300  $\text{\AA}$ ) e detecção a 220 nm, com os seguintes gradientes lineares:

- **Etapa 1:** Gradiente de 1 a 30% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA), fluxo de 3,0 mL/min. Nesta etapa, a FRAÇÃO 1 foi coletada até o gradiente de solvente B atingir 6,5% e a FRAÇÃO 2 foi coletada de 6,5-13% de solvente B. A etapa 1 ocorreu em aproximadamente 40 minutos.
- **Etapa 2:** de 13 a 90% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA), fluxo de 3,0 mL/min. Nesta etapa foi então coletada a FRAÇÃO 3. A etapa 2 ocorreu em aproximadamente 30 minutos.

### **3.13 Análise MALDI-TOF**

As análises por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF foram realizadas em instrumentos Shimadzu (Axima Performance; Kratos-Shimadzu Biotech, Manchester, UK) operados em modo positivo refletivo (Reflectron Mode) pelo software Shimadzu Biotech Axima Performance versão 2.9.3.20110624. As amostras foram diluídas 1:1 diretamente na matriz de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA) e spotadas diretamente na placa. A calibração externa do equipamento foi realizada utilizando-se de peptídeos sintéticos (ProteoMass Peptide and Protein Maldi-MS Calibration Kit; Sigma-aldrich). Para a determinação da massa monoisotópica de moléculas com massa entre 700 e 4.500 Da, foram utilizados os parâmetros: poder do laser fixado em 80% limitado a 50 Hz; pulse extraction foi otimizado à  $m/z$  1500 Da. Para processamento de todos os espectros obtidos foram

selecionados picos com largura de 5, com método de smoothing de Gaussian (com filtro de smoothing de 5 chans) e um filtro de linha de base de 5 chans.

### 3.14 Avaliação da atividade biológica

#### 3.14.1 Atividade antioxidante pelo método do radical ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico)

A determinação da atividade antioxidante foi feita segundo Re et al. (1999), com as seguintes modificações: o radical  $ABTS^{•+}$  foi preparado pela reação de 5,0  $\mu$ L de uma solução estoque de ABTS (7 mM) adicionado de 88  $\mu$ L da solução de persulfato de potássio (140 mM), armazenado durante 16 h a 25°C em ausência de luz. Completada a reação, a solução do radical foi diluída em etanol até absorvância de 0,7 ( $\lambda = 734$  nm) (Leitora de placas Biotek®-Epoch). Em placa de 96 poços, foram adicionados 5,0  $\mu$ L de amostra e 245  $\mu$ L do radical  $ABTS^{•+}$  previamente preparado e após 6 minutos de reação foi feita a leitura da absorvância. Todas as análises foram realizadas em triplicata, o trolox foi utilizado como referência padrão e os resultados de atividade antioxidante obtidos pela equação 11:

$$\%Redução\ de\ ABTS = \frac{[Ab - Aa] \times 100}{Ab} \quad (11)$$

onde Ab= absorvância do branco e Aa= absorvância da amostra.

#### 3.14.2 Atividade quelante de íons ferro

A determinação da atividade quelante de ferro foi adaptada de Kim et al. (2007) como se segue: 200  $\mu$ L de amostra; 800  $\mu$ L de água ultrapura e 20  $\mu$ L de  $FeCl_2$  (2 mM em água). A reação foi iniciada pela adição de 40  $\mu$ L de ferrozina (5mM em água). A mistura foi agitada e deixada em temperatura ambiente por 10 min. A absorvância foi medida em  $\lambda = 562$  nm.

A atividade quelante do íon ferro foi calculada segundo a equação 12:

$$QF (\%) = [(A0 - A1)/A0] \times 100 \quad (12)$$

onde A0= absorvância do controle e A1= absorvância da amostra. O controle foi feito com água ultrapura e o branco com solução de EDTA 2%.

### 3.14.3 Atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana foi determinada pela técnica de diluição em microplacas (96 orifícios) de acordo com a norma M7-A6 do Manual Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2006). As suspensões bacterianas *E. coli* (ATCC 43895) e *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644) foram padronizadas por espectrofotometria a partir de uma cultura de 24 horas, em caldo Muller Hinton (CMH) até  $1,0 \times 10^7$  UFC/mL em  $\lambda = 620$  nm. Após incubação a 37°C por 24 h foi feita leitura de absorbância em  $\lambda = 595$  nm em Leitora de placas Biotek® - Epoch. O controle positivo foi feito pela leitura de absorbância do meio CMH mais a suspensão bacteriana e o antibiótico ciprofloxacina 0,01 mM, enquanto que o controle negativo dado pelo meio CMH mais a suspensão bacteriana. O controle da amostra realizado pelo meio CMH mais a amostra. A partir da leitura espectrofotométrica foi determinada a porcentagem de inibição microbiana para cada micro-organismo.

### 3.14.4 Atividade antifúngica

A determinação da atividade antifúngica foi feita segundo a norma M27-A3 do Manual Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008) empregando uma cepa de *Candida albicans* ATCC 18804. As amostras foram avaliadas nas concentrações de 10 a 0,07 mg/mL (diluição seriada). Como controle positivo foi utilizado anfotericina B (16,0 a 0,06 µg/mL) e o fluconazol (512 a 1,0 µg/mL). Os cálculos que expressaram a porcentagem de viabilidade do micro-organismo feita segundo Gudiña et al. (2010) e o MIC foi considerado como a menor concentração de amostra analisada que é capaz de inibir o crescimento de 90% das cepas (HÖRNER et al., 2008).

## 3.15 Estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os resultados foram expressos como média±desvio padrão. A análise estatística das atividades biológicas foi feita pelo Anova One Way ou Two Way (Holm-Sidak method), utilizando o software Sigma Stat versão 3.11 (Systat Software Inc., USA). Para comparação entre duas médias foi realizado o teste t (Tukey).

#### 4. Resultados e discussão

Os resultados provenientes da caracterização cinética da enzima livre e derivados mais o perfil de imobilização podem ser visualizados nas Tabelas 7 e 8.

**Tabela 7.** Caracterização cinética da enzima livre e dos derivados usando o substrato sintético boc-Ala-ONp.

Enzima	Atividade enzimática	Km (mM)	Vmax	pH ótimo	Vmax/Km
AL	4426±287,91 U/mL	0,243	115,96 U/mL	8,0-9,5	477,2
AGA (87,6 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ grupos aldeídos)	13,80±0,31 U/g	1,53 (Km aparente)	25,08 U/g	6,5-10,0	16,39
AGSM (131, 8 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ grupos aldeídos)	9,54±0,38 U/g	0,464 (Km aparente)	10,50 U/g	7,0-10,0	22,6

**Tabela 8.** Perfil de imobilização da alcalase® em agarose e SM.

Enzima	Rendimento de Imobilização (%)	Atividade Recuperada (%)	Tempo de meia vida (horas)	Fator de estabilização
AL	-	-	0,5	-
AGA	71,02±12,86	100,0±0,00	2	4
AGSM	71,05±11,72	66,16±3,30	31	62

##### 4.1 Ativação dos suportes agarose e pó de sabugo de milho

Os dois suportes agarose e SM foram ativados a grupos glioxil. No final do estágio de ativação, a determinação de grupos aldeídos por iodometria resultou em 87,6  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  para a agarose (6 BCL) e 131, 8  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  com o pó de sabugo de milho após a oxidação utilizando 200  $\mu\text{mol}$  de  $\text{NaIO}_4$ . Portanto, a densidade de grupos reativos de superfície do SM apresentou ativação superior a agarose. Esta diferença pode estar relacionada com a composição dos dois suportes, pois enquanto segundo a agarose é constituída por cadeias lineares de  $\beta$ -D-galactopiranosil unidas por ligações (1,3) e unidades 3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactopiranosil unidas por ligações (1,4), o SM apresenta composição heterogênea sendo formado principalmente por celulose, hemicelulose e lignina. Desta forma, os dois suportes exibem distintas características que influenciam diretamente nas propriedades dos derivados obtidos, contudo a

presença de carboidratos possibilita que ambos sejam derivatizados utilizando reações amplamente consagradas na química de polissacarídeos (BEZERRA et al., 2015).

Esses resultados indicam que o SM possui elevada capacidade de formação de grupos aldeídos em sua superfície. Essa grande densidade de grupos pode ser um fator positivo ou negativo para a imobilização de enzimas, pois o suporte fará mais ligações covalentes com a enzima, possibilitando mais interações, porém ao mesmo tempo, será capaz de causar uma alteração conformacional na estrutura enzimática, que possivelmente perderá sua atividade.

O controle da concentração de periodato de sódio faz com que se tenham mais ou menos grupos aldeídos na superfície do suporte, desta forma, o grau de ativação permite controlar a intensidade da interação entre a proteína e o suporte (MATEO et al., 2006). Segundo Mateo et al. (2007), a obtenção de derivados com excelente atividade, especificidade e estabilidade está diretamente relacionada à utilização de suportes adequados para a imobilização de enzimas, ou seja, materiais que ofereçam grandes áreas superficiais para a interação suporte-proteína e apresentem boa congruência geométrica para que estas interações sejam otimizadas o tanto quanto possível. Também é desejável que estes suportes apresentem uma alta densidade de grupos reativos que possa proporcionar a formação de ligações multipontuais entre proteína-suporte além de outros fatores como estabilidade e reatividade dos grupos presentes em sua superfície.

#### **4.2 Imobilização covalente multipontual da alcalase®**

A enzima alcalase® foi imobilizada covalentemente em dois suportes: glioxil-agarose e glioxil-SM. A reação de imobilização enzimática foi cessada após 24 horas para os dois suportes, tempo estimado ótimo para obtenção de máxima estabilidade da alcalase® (YUST, et al. 2010). A imobilização da enzima, em geral, ocorre nos primeiros minutos de contato enzima-suporte. Porém, é necessário maior tempo de imobilização para permitir um rearranjo da enzima, de forma que ela se estabilize e se ligue por mais pontos ao suporte. A ligação covalente multipontual aumenta a estabilidade da enzima pela rigidificação de sua estrutura tridimensional, o que confere resistência às pequenas mudanças conformacionais causadas por calor, solventes orgânicos e outros agentes desnaturantes (PEDROCHE et al., 2007).

Os dois derivados apresentaram rendimento de imobilização semelhantes sendo 71,02% e 71,05% para AGA e AGSM respectivamente (Tabela 8). Para a atividade recuperada, obteve-se 100% para a agarose e 66,16% para o sabugo de milho. Este fato provavelmente deve-se à diferença na estrutura dos dois suportes. Cabe ressaltar que ambos

apresentam algumas discrepâncias na estrutura, área de superfície e porosidade, portanto, são esperadas diferenças como estas apresentadas acima, mesmo que a ativação dos suportes sejam idênticas. Embora AGSM tenha apresentado um valor de atividade recuperada inferior que AGA, ainda assim exibe uma medida superior a outras encontradas na literatura. Por exemplo, ao imobilizar a alcalase® em suporte glioxil-agarose Tardioli et al. (2003) obtiveram 54% de retenção da atividade, enquanto que Yust et al. (2010) alcançaram 51%.

Os resultados obtidos neste trabalho com o SM confirmam que esse resíduo lignocelulósico apresenta amplo potencial para imobilização de enzimas, fato que complementa valores já encontrados por nosso grupo de pesquisa. Por exemplo, Bassan et al. (2016) imobilizaram a tripsina em SM ativado com grupos glioxil, glutaraldeído e IDA-glioxil e obtiveram rendimento de imobilização e atividade recuperada superiores a 83% e 74% respectivamente. Além disso, o SM se destaca em relação à agarose por ser de baixo custo (~ 400 vezes menor).

### **4.3 Caracterização cinética da alcalase®**

O comportamento cinético da enzima imobilizada pode diferir significativamente daquele da mesma enzima na forma livre. Essas mudanças podem ser tanto devido às alterações conformacionais na enzima, resultante do processo de imobilização, quanto da presença e natureza do suporte de imobilização (GUISÁN, 2006; PEDROCHE et al., 2007).

A atividade enzimática da AL foi de 4426 U/mL enquanto a dos derivados AGSM e AGA foram 9,54 U/g e 13,80 U/g respectivamente (Tabela 7). A enzima livre mostrou maior atividade catalítica que os derivados, pois provavelmente em decorrência da imobilização, o substrato apresentou acesso limitado ao centro ativo da enzima e, em consequência, menor atividade enzimática provocada pelo efeito difusional. Além disso, a atividade de AGSM foi menor que AGA, provavelmente devido a maior densidade de grupos reativos presentes na superfície do suporte que originou uma grande quantidade de proteínas imobilizadas e possível alteração conformacional.

A constante de Michaelis ( $K_m$ ) é um parâmetro que mostra a afinidade da enzima pelo substrato. Os resultados da caracterização cinética revelam que a alcalase® se trata de uma enzima Michaeliana e possui boa afinidade pelo substrato. De acordo com a Tabela 7, pode-se observar que a alcalase® livre apresentou melhor afinidade pelo substrato com relação aos derivados, pois obteve menor valor de  $K_m = 0,243$  mM e maior  $V_{max} = 115,96$  U/mL. Os menores valores de  $K_m$  dos derivados em comparação a AL podem ser atribuídos

provavelmente aos efeitos difusionais da imobilização, o que dificulta o acesso do substrato a enzima.

Quando suportes porosos, como glioxil-agarose e glioxil-SM são empregados para imobilização, parte da enzima é imobilizada na superfície e outra no interior do suporte, o que pode ocasionar problemas de acesso do substrato a estas enzimas, delimitando a velocidade de ação da enzima imobilizada. Segundo Pessato (2014), esse acontecimento, denominado impedimento estérico, se refere à superfície do suporte limitando o acesso do substrato macromolecular aos sítios ativos da enzima.

Comparando-se os dois derivados, pode-se dizer que AGSM possui melhor especificidade do que AGA, devido ao menor valor de  $K_m$  aparente= 0,464 mM. Porém, AGA obteve maior  $V_{max}$ = 25,08 U/g do que AGSM= 10,50 U/g. Segundo Bassan (2015), uma possível explicação para este fenômeno seria a porosidade dos suportes, pois é provável que parte da carga de enzima oferecida para imobilização esteja sendo imobilizada no interior do poro do SM. Se isso é uma verdade, a imobilização no interior do poro poderia ser uma barreira física para o efetivo contato da enzima com o substrato, o que justificaria a sua menor  $V_{max}$ .

A ação catalítica de uma reação enzimática é alcançada dentro de limites muito estreitos de pH. O pH de melhor atividade de atuação da alcalase® varia de 6,5 a 8,5 (YUST, et al., 2010), enquanto que em pH 1 e 2 a enzima sofre desnaturação e ao redor de pH 4 uma mistura de enzima ativa e desnaturada pode levar à autólise (TARDIOLI, 2003). Na Tabela 7 são expostos os valores de pH ótimo encontrados neste trabalho para AL (8,0-9,5), AGA (6,5-10,0) e AGSM (7,0-10,0). Pode-se dizer que esses resultados concordam suficientemente bem com os encontrados na literatura (Tabela 9).

**Tabela 9.** pH ótimo da alcalase®.

<b>Enzima</b>	<b>Substrato</b>	<b>pH ótimo</b>	<b>Referência</b>
*AL	Proteínas do soro	9,0-9,5	Marques (2009)
AL	Proteínas da pele do salmão	8,39	See et al. (2011)
AL	Proteínas do soro	9,5	Tardioli (2003)
AL	Caseína	8,0	Ferreira et al. (2003)
*AGA	Proteínas do soro	9,5	Tardioli (2003)
Alcalase® glutaraldeído-sílica	Caseína	8,0	Ferreira et al. (2003)

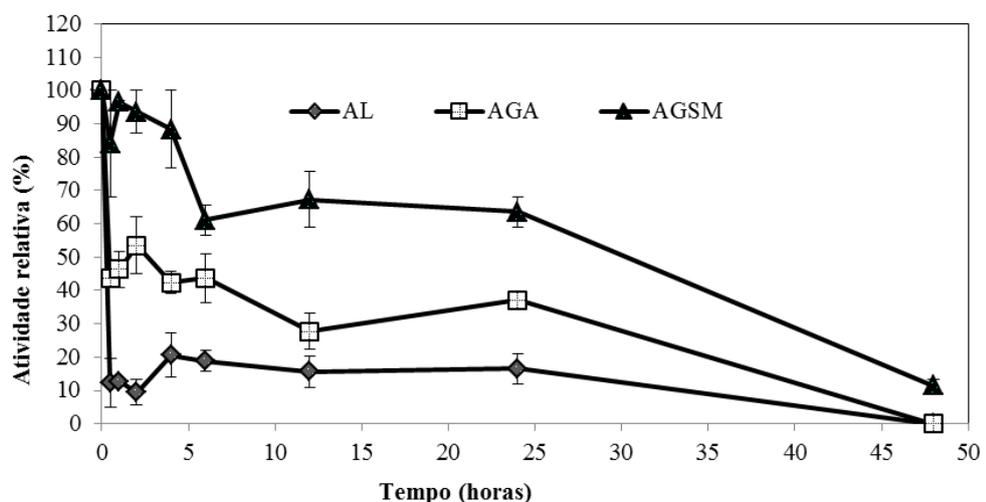
\*AL= alcalase livre; AGA= alcalase-glioxil-agarose.

#### 4.4 Estabilidade térmica e reuso

No presente estudo, o AGSM exibiu estabilidade térmica (65°C, pH 7,0) 62 vezes maior do que a AL, retendo 12% de sua atividade inicial após 48 horas, enquanto que a AL e AGA perderam totalmente a atividade. Estes resultados (Figura 19, Tabela 8), foram excelentes e mostram que a alcalase® imobilizada em glioxil-SM pode ser usada em determinados processos por períodos superiores a 24 h. Além disso, são equiparáveis com a literatura. Por exemplo, Tardioli (2003) obteve AGA 3,6 vezes mais estável que AL a 60°C. Yust et al. (2010) produziram um derivado AGA 24 vezes mais estável do que a AL a 50°C. Estudo realizado por Pessato (2014) relata que a imobilização da alcalase® em suporte glioxil-agarose aumentou a estabilidade da enzima quando essa foi exposta a temperatura de 65°C, sendo que AGA manteve 15% de sua atividade inicial em 90 min de incubação, enquanto que AL perdeu totalmente a atividade em 60 min.

A estabilidade térmica da enzima é um parâmetro físico muito importante para se verificar o quanto a imobilização é capaz de manter ou interferir nas características cinéticas em relação à enzima livre (PESSATO et al., 2016). Além disso, é uma variável imprescindível na obtenção de hidrolisados proteicos, pois permite que se trabalhe em temperaturas maiores por períodos prolongados, o que evita o crescimento microbiano no reator (PESSATO, 2014; BASSAN, 2015).

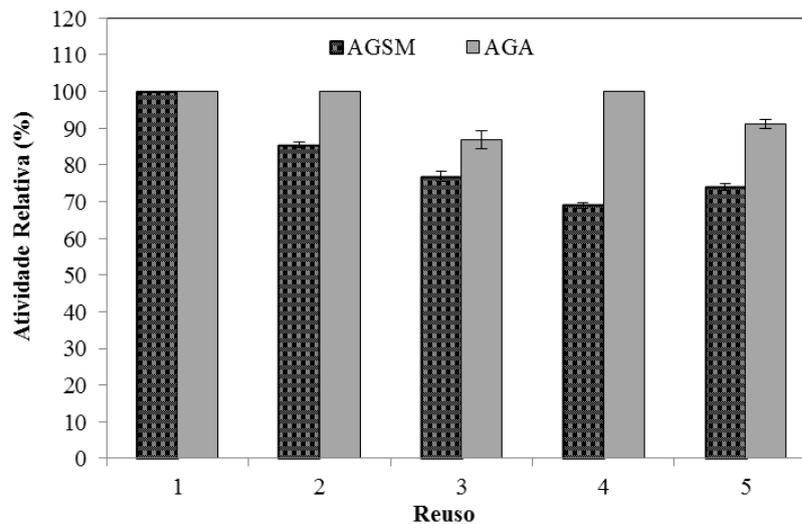
**Figura 19.** Estabilidade térmica a 65°C da alcalase® livre e derivados.



Segundo Mateo et al. (2010), enzimas industriais são frequentemente utilizadas em um único ciclo, no entanto, quando são imobilizadas podem ser reutilizadas por diversos ciclos, o

que representa uma economia de tempo, enzima e custos. Conforme os resultados apresentados na Figura 20, o derivado AGSM apresentou capacidade de reutilização de cinco ciclos de reuso de 24 h consecutivos no qual o derivado manteve sua atividade maior que 70%. Essa capacidade de reuso favorece de forma excepcional a economia do processo para a hidrólise das soroproteínas.

**Figura 20.** Ciclos de reuso dos derivados estáveis AGSM e AGA. Cada ciclo ocorreu por 24 horas de hidrólise das soroproteínas de queijo (50°C/pH 9,0).



#### 4.5 Dosagem de lactose e proteínas no soro tratado

Os resultados obtidos para o açúcar redutor no soro foram de 60 g/L (soro bruto) e 3,53 g/L (soro tratado). De acordo com os resultados, pode-se dizer que a diálise contra água destilada foi eficiente na diminuição a níveis bastantes significativos de lactose, ou seja, 94,11% em relação ao valor inicial. As concentrações de proteína foram obtidas após diálise, que removeu os componentes interferentes, tais como os oligopeptídeos e resíduos de aminoácidos liberados durante a coagulação enzimática do leite. Bassan et al. (2015) reduziu mais de 90% a concentração de lactose no soro tratado, após a diálise e filtração com caulin. Segundo os autores, a remoção destes compostos é importante para a determinação da concentração de proteína para que se tenha o mínimo possível de interferentes.

O teor de proteínas do soro de queijo tratado foi de 11,58 mg/mL, sendo maior que a concentração de 5,4 mg/mL encontrada em trabalho realizado por Romám et al. (2011) e superior a 7,2 mg/mL da constatada por Bassan (2015). Cabe ressaltar que, além dos métodos analíticos e tratamentos utilizados, as diferenças de concentração destes compostos estão

relacionadas a fatores genéticos e ambientais conforme já descrito pela literatura (BASSAN et al., 2015).

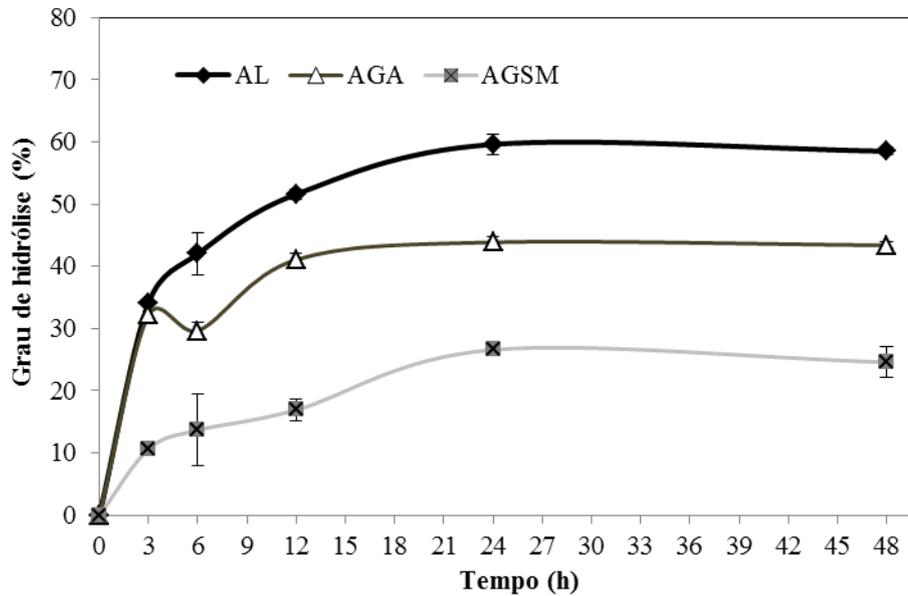
#### **4.6. Reator em batelada: sistema descontínuo**

##### 4.6.1 Caracterização dos hidrolisados proteicos obtidos em sistema descontínuo

###### 4.6.1.1 Grau de hidrólise (GH)

Segundo Adler-Nissen (1979), o grau de hidrólise é definido como o número de ligações peptídicas clivadas ou número de grupos amino livres formados durante o processo de hidrólise. Com o objetivo de verificar e comparar a eficiência da alcalase® livre e imobilizada na hidrólise das proteínas do soro de queijo foram determinados o GH para AL, AGA e AGSM durante 48 h (Figura 21). As médias do GH obtidas com AL e AGA foram de 59,63 e 43,88% respectivamente, enquanto que AGSM alcançou média de 26,59%. Como já era esperado, a AL apresentou maior GH comparado aos derivados, pois quando solúvel em um meio reacional não há problemas relacionados à difusão do substrato. O derivado AGSM apresentou GH menor do que AGA. Este resultado pode estar relacionado às alterações conformacionais na enzima, resultante do processo de imobilização, o qual depende da natureza do suporte de imobilização (GUISÁN, 2006). Entretanto, o resultado de GH obtido por AGSM ainda é bastante elevado e equiparável com outros descritos na literatura. Kim et al. (2007), testaram diferentes enzimas na hidrólise de proteínas do soro de leite e constataram que a hidrólise máxima (GH=13,6%) das frações proteicas  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg foi alcançada com o uso de alcalase® livre. Zheng et al. (2008), utilizando alcalase® livre na hidrólise de proteínas do soro, obtiveram GH de 20%. Pessato et al. (2016) ao realizar a hidrólise do isolado proteico de soro de leite bovino (IPS) utilizando alcalase® imobilizada em agarose obtiveram valor de GH entre 9,5 a 22,2%. No presente trabalho, o GH final teve um valor mais elevado em comparação aos trabalhos aqui citados mostrando que a enzima alcalase® imobilizada em SM representa uma interessante forma para a obtenção de hidrolisados proteicos, possibilitando economia, aproveitamento de resíduo lignocelulósico abundante, de baixo custo e excelente para o processo de imobilização.

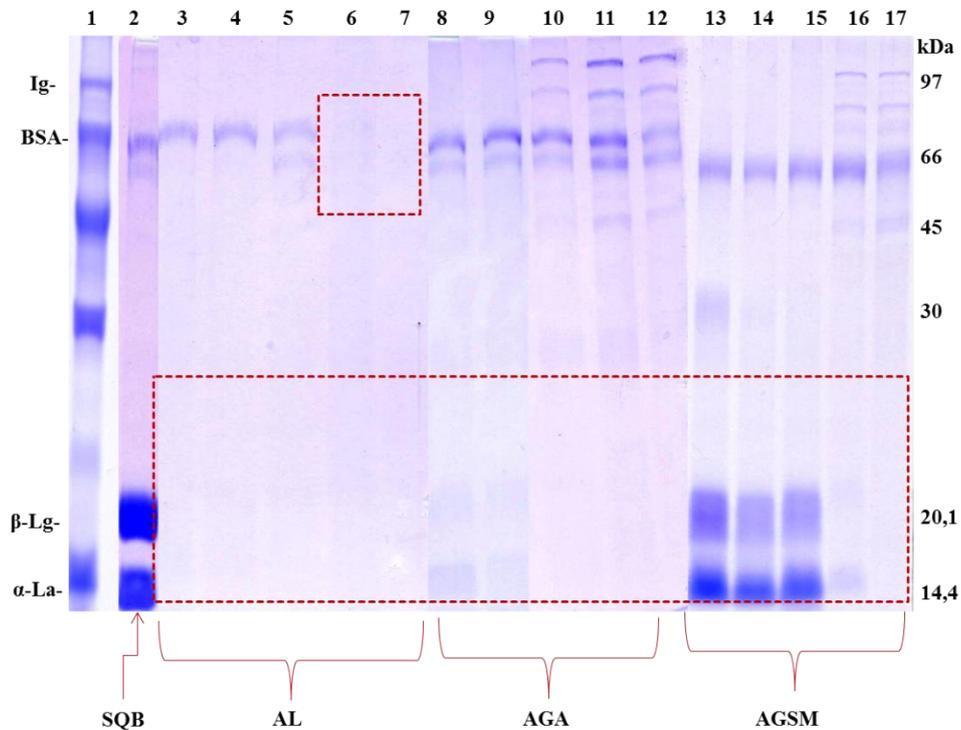
**Figura 21.** Grau de hidrólise obtido pela hidrólise das soroproteínas em sistema descontínuo usando AL (0,5 mL; 8,23 U/mL), AGA (0,5 g; 13,8 U/g) e AGSM (0,5 g; 9,54 U/g) em diferentes tempos de reação. Para cada ensaio foram utilizados 20 ml de soro de queijo tratado (pH 9,0; 50°C/48h; 100 rpm).



#### 4.6.1.2 SDS-PAGE e RP-HPLC

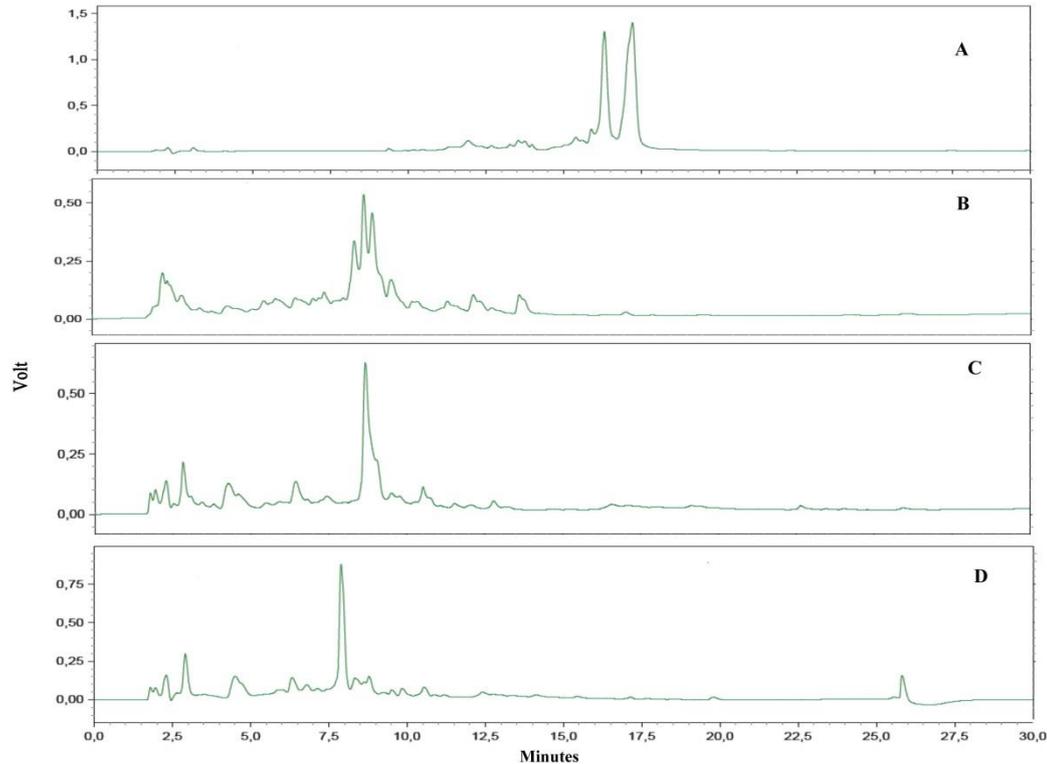
O perfil eletroforético do soro e dos produtos de hidrólise utilizando AL e os derivados AGA e AGSM em diferentes tempos de reação é apresentado na Figura 22. Na raia 2 foram adicionadas as proteínas do soro de queijo bovino não hidrolisadas. As raias 3 à 7, 10 à 12 e 16 à 17 mostram o desaparecimento das bandas proteicas referentes a hidrólise de  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg, indicando que a alcalase® possui afinidade pelas respectivas proteínas. Estes resultados também revelam que Ig e BSA são hidrolisadas totalmente pela AL após 24 h (raias 6 e 7), e pouco hidrolisadas pelos derivados AGA (raias 8 à 12) e AGSM (raias 13 à 17).

**Figura 22.** SDS-PAGE 12%: perfil eletroforético das proteínas do soro de queijo bovino e dos hidrolisados proteicos do soro. (1) Padrões de massa molar. (2) Soro do queijo bovino. Tempo de hidrólise em horas usando **AL**: (3): 3h; (4): 6h; (5): 12h; (6): 24h; (7): 48h; **AGA**: (8): 3h; (9): 6h; (10): 12h; (11): 24h; (12): 48h e **AGSM**: (13): 3h; (14): 6h; (15): 12h; (16): 24h; (17): 48h. Ig: imunoglobulina; BSA: albumina de soro bovino;  $\alpha$ -La: alfa-lactalbumina;  $\beta$ -Lg: beta-lactoglobulina.



As soroproteínas do queijo bovino foram analisadas por RP-HPLC (Figura 23A) e apenas dois picos foram detectados (tR 18,5-20,0 min), correspondendo provavelmente a  $\beta$ -Lg e  $\alpha$ -La, que representam juntos 70- 80% das proteínas de soro total. Ao analisar o perfil cromatográfico dos hidrolisados (48 h), o sinal desses dois picos desapareceu e novos picos surgiram (tR 1,0 a 12,5 min), indicando a liberação de peptídeos por meio de AL, AGA e AGSM (Figura 23 B, C e D). Estes dados cromatográficos confirmam os resultados obtidos com SDS-PAGE.

**Figura 23.** RP-HPLC do soro não hidrolisado (A) e hidrolisados proteicos obtidos com AL (B); AGA (C) e AGSM (D) após 48 h de hidrólise em sistema descontínuo. Utilizou-se gradiente linear de 5 a 95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 minutos, fluxo de 1,0 mL/min e detecção a 220 nm.

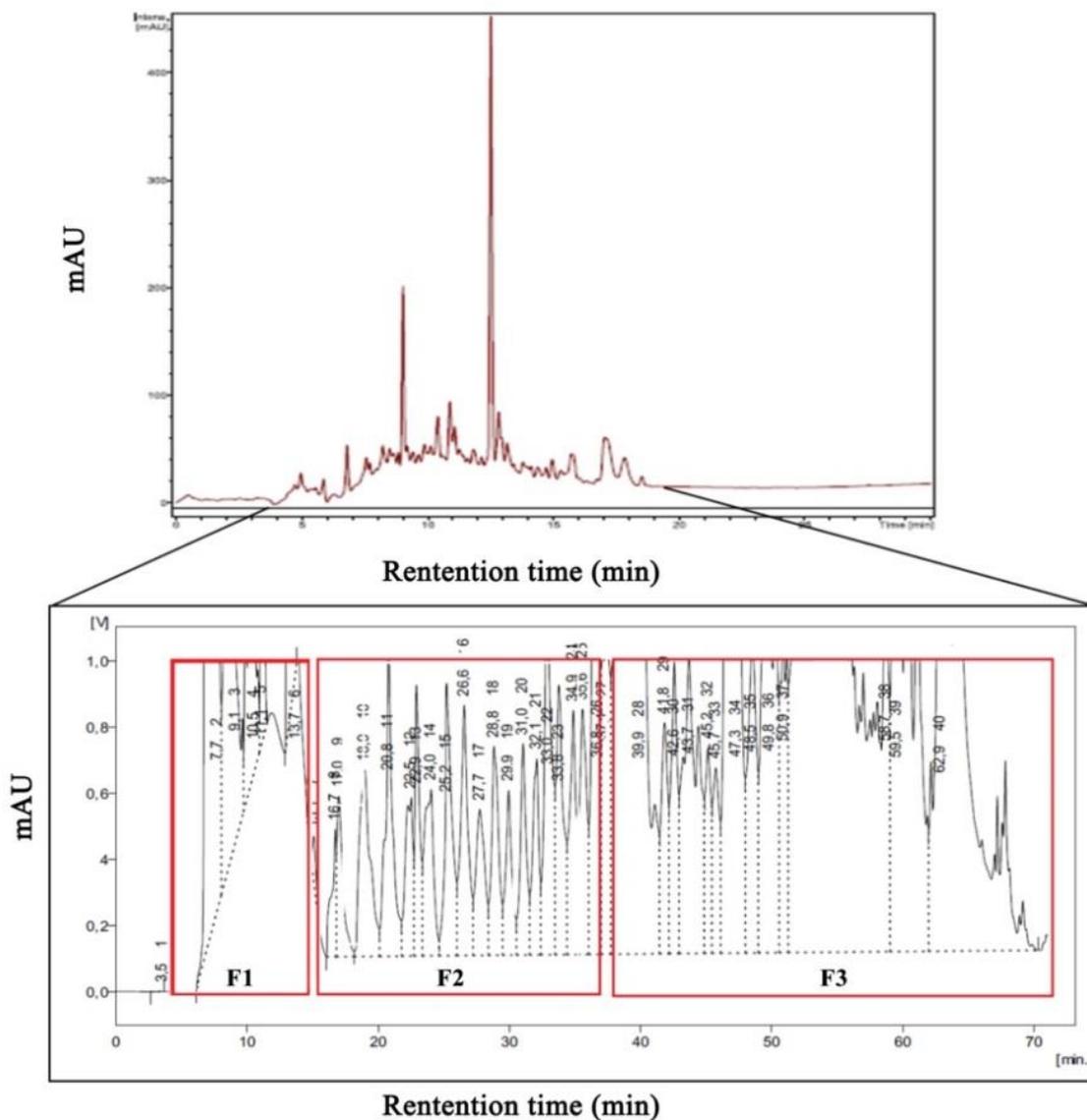


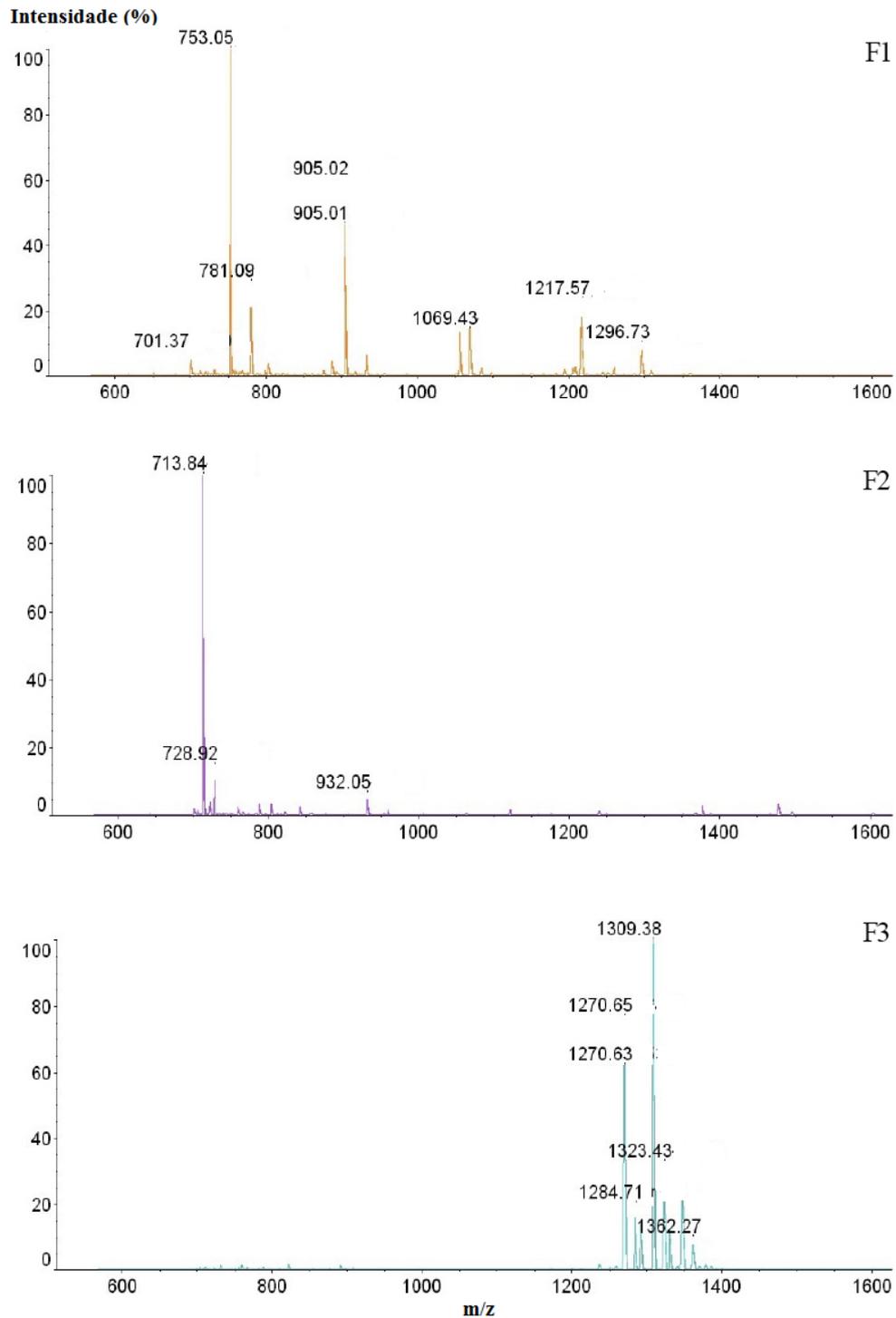
#### 4.6.1.3 Fracionamento dos hidrolisados por RP-HPLC e análise MALDI-TOF

Os peptídeos obtidos com o derivado AGSM foram fracionados por RP-HPLC de acordo com a hidrofiliicidade. A massa molecular (MM) das frações foi determinada por espectrometria de massas MALDI-TOF. Os resultados são apresentados nas Figuras 24 e 25. O tempo de eluição dos peptídeos variou conforme a polaridade da fase móvel: os peptídeos mais hidrofílicos foram eluídos nos primeiros minutos, enquanto os peptídeos menos hidrofílicos foram retidos por mais tempo. Portanto, F1 representa os peptídeos mais hidrofílicos, F2 de hidrofiliicidade intermediária e F3 formada pelos peptídeos hidrofóbicos. O tempo de eluição durou aproximadamente 70 min.

As frações foram analisadas por MALDI-TOF na faixa de massa de 700 e 4500 Da. Foram identificados 8 peptídeos na F1 com massa molecular variando entre (701,37-1296,73 Da), 3 peptídeos na F2 (713,84-932,05 Da) e 6 peptídeos na F3 (1270,63-1362,27 Da). Isto indica que a hidrólise das proteínas do soro de queijo em sistema descontínuo utilizando o derivado AGSM foi capaz de produzir peptídeos de massa molecular (< 1500 m/z).

**Figura 24.** Fracionamento dos peptídeos por RP-HPLC. Frações (F1), (F2) e (F3) obtidas com AGSM em RB após 48 h de hidrólise. Foi feito em modo semi-preparativo com coluna de fase reversa Júpiter Phenomenex C18 (250 x 10 mm; 15  $\mu$ m; 300  $\text{Å}$ ) e detecção a 220 nm. Utilizou-se gradiente de 1 a 90% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA), fluxo de 3,0 mL/min em 70 minutos.



**Figura 25.** Espectro MALDI-TOF para as frações F1, F2 e F3.

#### 4.6.2 Atividade biológica

##### 4.6.2.1 Atividade antioxidante

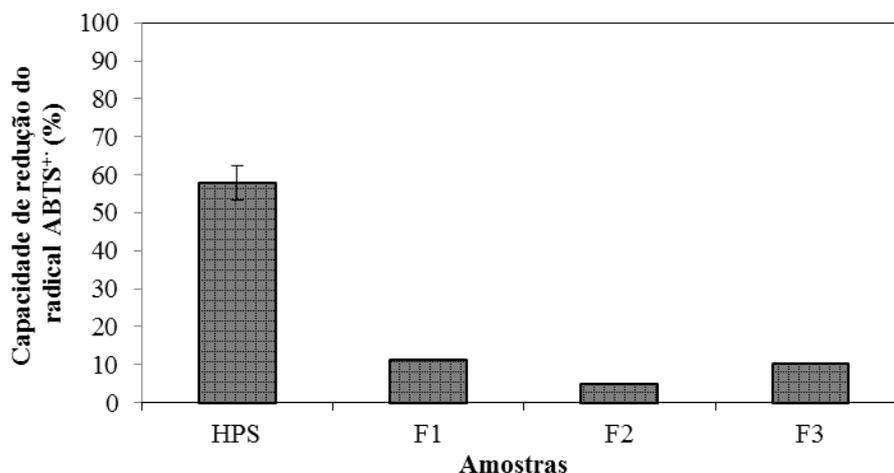
Hidrolisados proteicos são relatados como antioxidantes devido à capacidade de inativar espécies reativas de oxigênio (ROS), sequestrar radicais livres, inibir a peroxidação

lipídica, quelar íons metálicos, ou pela combinação desses mecanismos (PIHLANTO, 2006). A atividade antioxidante dos produtos obtidos nesta pesquisa foi determinada pelo método do radical ABTS. Esta técnica tem sido reportada na literatura como a mais eficiente na avaliação de hidrolisados proteicos (DRYÁKOVÁ et al., 2010; BRANDELLI; DAROIT; CORRÊA, 2015). A escolha do método é fundamental, por se tratar de mistura complexa de peptídeos e aminoácidos, portanto, distintos mecanismos de ação antioxidante podem agir concomitantemente.

No presente estudo (Figura 26), o hidrolisado proteico do soro (HPS) obtido por AGSM antes do fracionamento apresentou elevada capacidade de redução do radical ABTS (57,82%) sendo condizente com outros valores encontrados na literatura. Corrêa et al. (2014) utilizando uma protease de *Bacillus P7* para hidrolisar proteínas do soro de queijo de ovelha obtiveram atividade antioxidante de 51,3% pelo mesmo método. DUARTE (2014), empregando protease produzida pelo *P. aurantiogriseum* URM 4622 e imobilizada em nanopartículas magnéticas para a hidrólise da caseína bovina comercial obtiveram peptídeos capazes de reduzir 44,35% o radical ABTS.

Wei e Chiang (2009) estudaram a atividade antioxidante pelo método do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) em peptídeos bioativos obtidos pela hidrólise de proteínas de sangue de suínos com uma mistura de tripsina, quimotripsina e termolisina e alcançaram 65% de redução após 6 e 10 horas respectivamente. Quando a hidrólise foi realizada em reator enzimático contínuo de membrana, a atividade atingida foi de 54% após 2 horas de reação.

**Figura 26.** Atividade antioxidante do HPS (antes do fracionamento) e frações (F1), (F2) e (F3) utilizando AGSM após 48 h de hidrólise em RB.



Segundo Conway et al. (2012), alguns fatores exercem grande influência na atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos do soro como perfil peptídico formado, diferentes sequências de aminoácidos produzidas, massa molecular dos peptídeos, presença de diferentes grupos iônicos ou aminoácidos aromáticos, especificidade da enzima, condições de hidrólise e o tempo de reação enzimática. O alto potencial antioxidante dos hidrolisados proteicos obtidos com o derivado AGSM pode ser atribuído à hidrólise de  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg conforme Figura 22. Diversos estudos têm relatado que hidrolisados proteicos provenientes dessas duas soroproteínas apresentam capacidade antioxidante. Conway et al. (2012), utilizando pepsina por 2 h, seguida de tripsina por 3 h, sugerem que a hidrólise de  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg foi responsável pela obtenção de peptídeos com potencial antioxidante. Segundo Brandelli, Daroit e Corrêa (2015), fragmentos da  $\beta$ -Lg LQKW f(58-61), LDTDYKK f(95-101) e FNPTQ f(151-155) obtidos com termolisina apresentaram capacidade de atividade antioxidante.

O alto potencial de atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos do soro obtidos com o derivado AGSM pode ser atribuído também à especificidade da enzima alcalase®. O mecanismo de ação da enzima e subsequente presença de grupos hidroxilas ou compostos fenólicos presentes nos peptídeos formados influenciam a atividade antioxidante (HOGAN et al., 2009). Segundo Gobba et al., (2014), a subtilisina, que cliva ligação peptídica em resíduos de leucina, fenilalanina, serina, tirosina, ácido glutâmico ou triptofano, pode liberar peptídeos com o aminoácido tirosina no C-terminal, uma característica estrutural conhecida por aumentar a atividade antioxidante em hidrolisados proteicos do soro. Dryáková et al. (2010), estudando a hidrólise das proteínas do soro utilizando proteases microbianas, reportaram que a alcalase® foi a enzima que apresentou maior eficiência na obtenção de compostos antioxidantes com 54% de capacidade de redução do radical ABTS.

É possível observar na Figura 26, que os resultados de atividade antioxidante obtidos para o HPS são superiores aos das frações (F1, F2 e F3). Provável explicação para este fenômeno é dada pelo sinergismo entre a sequência de aminoácidos específicos, a estrutura molecular e os grupos funcionais presentes que segundo Hogan et al. (2009) estes são os principais fatores que contribuem para o potencial antioxidante de peptídeos. Uma vez que, após o fracionamento dos peptídeos ocorre a diminuição da interação entre os compostos. Apesar disso, os resultados de atividade antioxidante para as frações (F1, F2 e F3) são condizentes aos encontrados por Ruiz-Ruiz et al. (2013), sendo que esses autores estudaram hidrolisados proteicos do feijão após o fracionamento de peptídeos em HPLC (<1 kDa) em 10 frações e obtiveram valores baixos entre 6,09 a 24, 28% de capacidade de redução de ABTS.

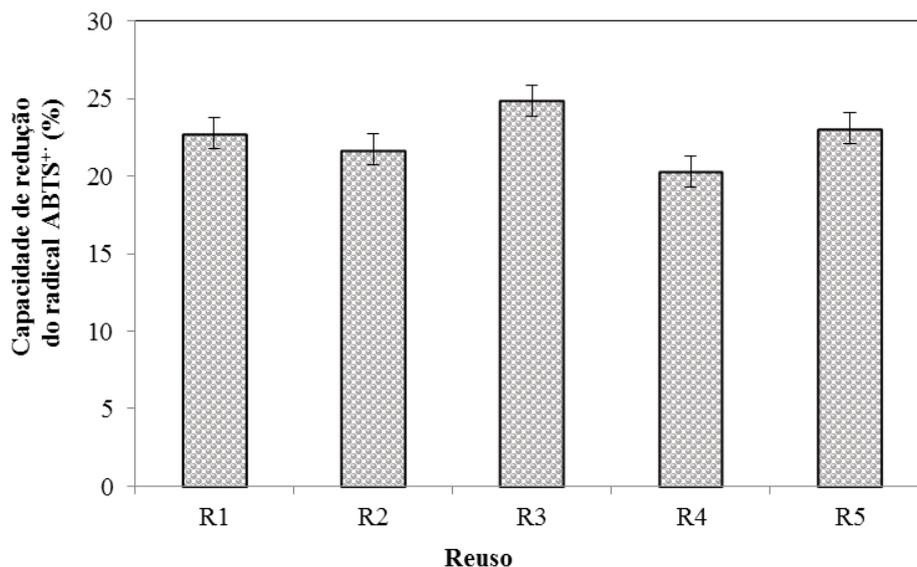
Como observado na Figura 26, houve diferença significativa ( $P < 0,001$ ) na atividade antioxidante entre as três frações ( $F1 > F3 > F2$ ). Os resultados obtidos são condizentes com a literatura, pois segundo Segundo Brandelli, Daroit e Corrêa (2015), a atividade antioxidante de peptídeos gerados pela hidrólise de proteínas *in vitro* está relacionada com a presença de grupos ionizáveis e também com a exposição de grupos hidrofóbicos.

#### 4.6.2.2 Atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos obtidos após ensaio de reuso

Os resultados de avaliação da capacidade antioxidante nos hidrolisados obtidos por AGSM após os ciclos de reuso encontram-se na Figura 27 onde é possível observar que a capacidade de redução do ABTS dos hidrolisados proteicos manteve-se constante após os 5 ciclos de reuso. Não houve diferença significativa ( $P = 0,05$ ) entre os reusos.

Com esses resultados obtidos, pode-se concluir que a imobilização da alcalase® em suporte inovativo de baixo custo pó de sabugo de milho é praticável e atraente, pois foi eficaz na hidrólise das proteínas do soro gerando produtos com expressiva capacidade antioxidante e possibilitando a economia de produção destes compostos pela possibilidade de reutilização do derivado, mantendo a atividade antioxidante após os 5 reusos.

**Figura 27.** Atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos obtidos pelos ensaios de reuso utilizando AGSM na hidrólise descontínua das proteínas do soro. Em cada ciclo 1,0 g do derivado foi adicionado a 20 mL de soro e incubado a 50°C, pH 9,0 e 100 rpm de agitação durante 24 horas.

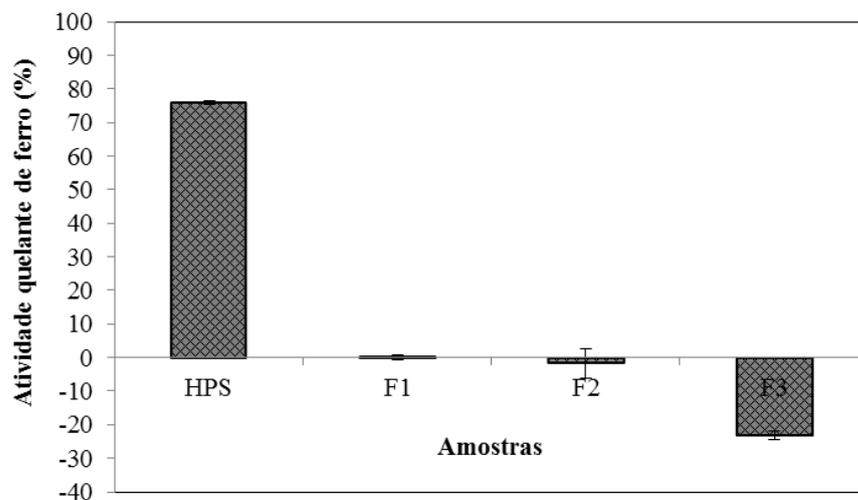


#### 4.6.2.3 Atividade quelante de ferro

A palavra quelato é originária do grego “chele”, da qual a tradução é pinça ou garra. A estrutura dos quelatos é resultado do compartilhamento de elétrons entre um metal e um ligante. Aminoácidos e pequenos peptídeos provenientes da hidrólise enzimática são ligantes ideais, pois em um ambiente aquoso, encontram-se no estado zwitteriônico, com o grupo carboxílico e amino ionizados com cargas opostas e, portanto, ambos os grupos podem participar da reação de quelação com o íon metálico (ASHMEAD, 2001). Na atividade quelante de íons ferro II, a ferrozina, agente cromogênico, torna a solução rósea de acordo com a quantidade de ferro disponível em solução. Assim, quanto maior a quelação de íon na amostra, menor o número de íons ferro II não disponíveis para a reação com a ferrozina e menor será a intensidade da cor (SANTOS et al., 2007).

A Figura 28 mostra que o HPS obtido por AGSM antes do fracionamento apresentou elevada atividade quelante de ferro II (76,2%). Na literatura é possível encontrar resultados semelhantes, por exemplo, Girgih et al. (2013) relataram atividade quelante de ferro de 34% por peptídeos presentes nos hidrolisados proteicos do salmão. Gobba et al. (2014) determinaram que os valores de atividade quelante de ferro com hidrolisados proteicos de leite de cabra variaram entre 20 e 80%. No entanto, como é possível observar na Figura 28, a atividade quelante de ferro para as frações (F1, F2 e F3) foram nulas.

**Figura 28.** Atividade quelante de íons ferro do HPS (antes do fracionamento) e das frações (F1), (F2) e (F3) utilizando AGSM após 48 h de hidrólise em RB.



Uma hipótese que pode elucidar este resultado seria a diminuição do sinergismo entre os peptídeos, pois concordantemente com Hogan et al. (2009), após o fracionamento ocorre a

diminuição do sinergismo entre os aminoácidos. Enquanto que, Kim et al. (2007) sugerem que as distintas composições de aminoácidos presentes em peptídeos antioxidantes exercem um importante papel na atividade quelante de metais de transição como o ferro e o cobre. Os autores citam ainda que a fosfoserina, o ácido glutâmico, a histidina e a cisteína contribuem para atividade quelante de metais.

Abeyrathne et al. (2016) mencionam que peptídeos com alta atividade quelante de ferro podem prevenir a oxidação e o crescimento microbiano. Portanto, estes compostos podem ser utilizados como agentes antimicrobianos em alimentos. Os antioxidantes contribuem para a quelação de metais de transição, que em excesso podem levar a peroxidação lipídica, com conseqüente lesão às membranas plasmáticas e à oxidação do DNA (SANTOS et al., 2007). Souza (2013) aponta que fragmentos de soroproteínas e, em especial da lactoferrina e da SBA são capazes de formar complexos com metais como o ferro e cobre, respectivamente.

A deficiência de ferro é um dos principais distúrbios nutricionais no mundo, sendo a suplementação de alimentos com sais de ferro uma relevante estratégia para combater essa carência. No entanto, nessa forma, o mineral apresenta baixa biodisponibilidade e pode ocasionar dor de estômago, diarreia, alterações de sabor e aparência dos produtos. Quelatos ferro-peptídeos têm sido indicados como uma promissora fonte de ferro mais biodisponível e com diminuição desses efeitos adversos (SILVA, 2013).

Assim, os hidrolisados proteicos do soro obtidos neste trabalho com o derivado AGSM podem ser utilizados em futuros estudos como na elaboração de alimentos contendo quelatos  $\text{Fe}^{2+}$  peptídeos, sendo que a ingestão deles também pode contribuir para dietas no tratamento de anemias. Esses resultados de avaliação da capacidade quelante de íon ferro, bem como a quantificação de compostos bioativos em hidrolisados proteicos é de interesse cada vez maior no mundo científico, uma vez que a saúde e a alimentação são consideradas prioridade máxima nas demandas da população mundial.

#### 4.6.2.4 Atividade antibacteriana

Na Tabela 10 é possível observar uma elevada atividade contra as suspensões bacterianas quando foi utilizado o HPS de AGSM antes do fracionamento e também para as frações F1, F2 e F3. Portanto, pode-se afirmar que as espécies *E. coli* (ATCC 43895) e *Listeria monocytogenes*, (ATCC 7644) foram susceptíveis à ação dos peptídeos obtidos neste estudo. Uma possível explicação para esses resultados seria a presença de diferentes proteínas

(principalmente  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg) com estruturas diversificadas no soro e que após a hidrólise foram fragmentadas e precursoras destes peptídeos bioativos conforme apresentado nas Figuras 22 e 23. Muitos peptídeos antimicrobianos têm sido identificados em diversos estudos, tanto provenientes da hidrólise enzimática da  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg (PELLEGRINI et al., 1999; PELLEGRINI et al., 2001; THÉOLIER et al., 2013) quanto da Lf (SINHA et al., 2013; RIPOLLES et al., 2015). Ademais, a  $\alpha$ -La apresenta fração rica em triptofano, lisina, treonina, leucina e cisteína que afeta positivamente a absorção de minerais sendo responsável pela ação antimicrobiana em *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae* (HARAGUCHI; ABREU; PAULA, 2006) e a Lf é uma glicoproteína que contém o elemento químico ferro ligado em sua estrutura. Devido a esta capacidade de ligação ao íon férrico, ela pode exercer efeito bactericida e bacteriostático contra uma ampla variedade de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, uma vez que esse elemento é um nutriente essencial para o crescimento desses micro-organismos. Além de sua capacidade quelante de ferro, Lf é capaz de bloquear o metabolismo microbiano interagindo com os carboidratos das membranas celulares bacterianas (SINHA et al., 2013; RIPOLLES et al., 2015).

**Tabela 10.** Atividade antibacteriana do HPS (antes do fracionamento) e das frações (F1), (F2) e (F3) dos peptídeos obtidos com AGSM após 48 h de hidrólise em RB. Foram usadas *E. coli* (ATCC 43895) e *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644) ( $1,0 \times 10^7$  UFC/mL; 37°C; 24 h). O controle positivo foi feito com o antibiótico ciprofloxacina 0,01 mM.

% Inibição de crescimento bacteriano				
Espécie de bactéria	HPS	F1	F2	F3
<i>E. Coli</i> ATCC 43895	87,75±6,31 <sup>B,d</sup>	99,4±1,10 <sup>A,b,c</sup>	100±0,72 <sup>B,a</sup>	100±8,70 <sup>A,b</sup>
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	95,77±4,94 <sup>A,b,c</sup>	93,33±4,41 <sup>A,b,c</sup>	100±0,00 <sup>A,a,b</sup>	93,33±2,89 <sup>B,b,c</sup>

Dados expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

Diferenças estatísticas entre processo e espécie de bactéria por ANOVA (medidas repetidas) seguido de Home-Sidak method ( $p < 0,05$ ).

\*Letras minúsculas iguais significam que não houve diferença estatística significativa no processo.

\*Letras maiúsculas iguais significam que não houve diferença estatística significativa entre as espécies de bactérias.

O antibiótico ciprofloxacina apresentou 100% de inibição de crescimento bacteriano.

Concentração testada: (20 mg/mL).

Considerando a diversidade de peptídeos antimicrobianos provenientes de  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg, torna-se difícil estabelecer qual a causa mais importante para a atividade observada. Provavelmente, o potencial antimicrobiano destes peptídeos é o resultado de múltiplos fatores

como a sequência de aminoácidos, tamanho e composição, estrutura secundária (particularmente helicoidal), ponto isoelétrico, carga líquida, distribuição de carga, caráter anfipático, especificidade da enzima, a proteína precursora da hidrólise (substrato) e o tipo de sistema de purificação empregado (DEMERS-MATHIEU et al., 2013; BRANDELLI; DAROIT; CORRÊA, 2015).

Os peptídeos antimicrobianos são classificados principalmente de acordo com seu mecanismo de ação e estrutura (HEGEDUS; MARX, 2013). O modo de ação compreende a associação com lipídeos de membrana plasmática microbiana, ocasionando o aumento de sua permeabilidade. Inicialmente acontece a atração eletrostática entre as moléculas de peptídeos (que geralmente possuem carga positiva) e lipídeos aniônicos presentes na membrana bacteriana. Seguidamente, a estrutura anfipática dos peptídeos antimicrobianos desempenha o seu papel, provocando a interação destes peptídeos com a interface hidrofílica/hidrofóbica presente na superfície das biomembranas, propiciando conseqüentemente a ruptura da membrana microbiana, a entrada do peptídeo no seu interior, o extravasamento do conteúdo citoplasmático, efetuando a inibição da síntese de DNA/RNA e de proteínas e, finalmente, a morte celular (NAGHMOUCHI et al., 2007; CARVALHO; MACHINI, 2013). Segundo suas estruturas secundárias, os peptídeos são classificados basicamente em dois grupos: peptídeo  $\alpha$ -hélice, compostos por peptídeos que apresentam hélices anfipáticas em membranas ou em locais semelhantes e peptídeo com folhas  $\beta$ , de estrutura rígida sendo estabilizado por pontes dissulfeto.

F1 (peptídeos hidrofílicos) não apresentou diferença significativa entre os microorganismos testados, enquanto que F2 (peptídeos de hidrofílicidade intermediária) apresentou maior atividade antimicrobiana tanto para *E. coli* quanto para *L. monocytogenes* (Tabela 10), sendo mais efetivo contra o segundo ( $p < 0,05$ ). Resultados semelhantes foram encontrados por El-Zahar et al. (2004), pois, segundo os autores, o fracionamento por RP-HPLC de peptídeos provenientes da hidrólise da  $\beta$ -lactoglobulina ovina demonstrou que a presença simultânea de peptídeos hidrofílicos e hidrofóbicos foi necessária para a determinação da atividade antimicrobiana de *E. coli* HB101, *E. coli* Cip812, *Bacillus subtilis* Cip5265 e *Staphylococcus aureus* 9973. Além disso, Salami et al. (2010), afirmam que os peptídeos de tamanhos menores, ou seja, formados por cadeias polipeptídicas com sequência entre 2 e 20 resíduos de aminoácidos apresentam maior efetividade na atividade antimicrobiana, pois possuem maior facilidade em se ligar aos lipídeos presentes na membrana celular das bactérias. Théolier et al., (2013), mostraram que peptídeos ( $< 1000$  Da) provenientes da hidrólise da  $\beta$ -Lg e  $\alpha$ -La

obtidos com pepsina exibiram atividade antimicrobiana significativa contra *Listeria ivanovii* HPB28 e *Escherichia coli* MC4100.

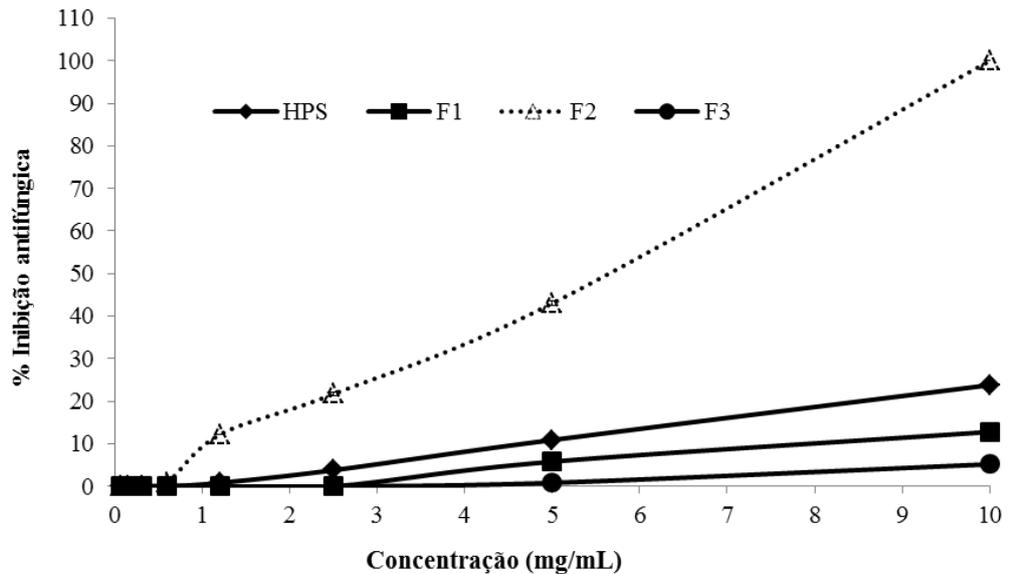
*E. coli* é um micro-organismo Gram-negativo, patógeno de grande importância para humanos e animais. Vários sorotipos deste micro-organismo têm implicados em doenças diarreicas, se constituindo num grave problema de saúde pública no mundo, com mais de dois milhões de mortes relatadas, a cada ano (SOUZA, 2006; THÉOLIER et al., 2013). *L. monocytogenes* é uma bactéria Gram-positiva considerada um agente significativo de origem alimentar que pode causar risco de vida e infecções em indivíduos suscetíveis e em muitas outras espécies de animais. As manifestações mais críticas de listeriose humana invasiva incluem abortos, encefalite, meningite e morte. A principal forma de infecção com *L. monocytogenes* é o consumo de alimentos prontos, carne, leite cru e produtos lácteos, sendo o queijo um dos envolvidos, principalmente, por este patógeno ter a capacidade de crescer e sobreviver durante a fabricação, maturação e armazenamento (DEMERS-MATHIEU et al., 2013; RIPOLLES et al., 2015). Desta forma, os peptídeos antimicrobianos obtidos com o derivado AGSM representam uma nova perspectiva para o desenvolvimento de antibióticos, sendo uma fonte promissora de produtos naturais para a indústria farmacêutica como também para a indústria de alimentos oferecendo benefícios como baixo custo, combate a infecções e elevação de vida útil do produto.

#### 4.6.2.5 Atividade antifúngica

Foi determinada a atividade antifúngica do hidrolisado proteico e dos seus respectivos peptídeos fracionados. Como é possível observar na Figura 29, apenas F2 mostrou ser efetivo contra a cepa de *Candida albicans* ATCC 18804 testada (MIC= 10 mg/mL), enquanto que o restante das amostras apresentaram MIC >20 mg/mL. Estes resultados sugerem que a capacidade de inibição do crescimento do fungo estudado está relacionada com os peptídeos de hidrofiliabilidade intermediária obtidos. Segundo Garibotto et al. (2010), a combinação de resíduos catiônicos e hidrofóbicos parece ser essencial para a o desenvolvimento da propriedade antifúngica. De acordo com os autores, peptídeos antifúngicos apresentam cadeias compostas de 12-50 resíduos de aminoácidos com carga líquida +2 ou +9 devido ao excesso de resíduos de aminoácidos básicos como arginina e lisina e 50% de aminoácidos hidrofóbicos. Estas moléculas são geralmente anfipáticas e variam consideravelmente no comprimento, sequência de aminoácidos e na estrutura secundária, sendo que a diferente

ordem espacial inclui pequenas folhas- $\beta$  estabilizadas por pontes dissulfeto,  $\alpha$ -hélice anfipáticas e menos comumente estruturas estendidas e/ou em *loop*.

**Figura 29.** Atividade antifúngica contra a cepa de *C. albicans* ATCC 18804 do HPS (antes do fracionamento) e das frações (F1), (F2) e (F3) utilizando AGSM após 48 h de hidrólise em RB. As amostras foram avaliadas nas concentrações de 10 a 0,07 mg/mL (diluição seriada). Como controle positivo foi utilizado anfotericina B (16,0 a 0,06  $\mu$ g/mL) e o fluconazol (512 a 1,0  $\mu$ g/mL).



Nas últimas décadas, a utilização indiscriminada de agentes antifúngicos promoveu o crescimento do número de pessoas tolerantes às drogas em dosagens terapêuticas. Este fato representa um grave risco aos imunocomprometidos, tais como os portadores do vírus HIV, os pacientes em tratamento quimioterápico, além daqueles que receberam transplantes de órgãos como também os recém-nascidos. As doenças causadas por fungos têm sido as principais causas de morbidade e mortalidade desses indivíduos, além de terem elevado impacto econômico mundial (CARVALHO; MACHINI, 2013). Como exemplo, pode-se citar o fungo *Candida albicans*, presente na microbiota natural, na mucosa da boca e no sistema reprodutor feminino. Considerado um patógeno oportunista, que se torna virulento quando seu hospedeiro encontra-se imunocomprometido, podendo ocasionar infecções superficiais, localizadas (candidíase) e sistêmicas (candidemia), além de responsável por índices elevados de mortalidades mundiais, ultrapassando os causados por infecções bacterianas (CLÉMENT et al., 2007; GARIBOTTO et al., 2010; HAN et al., 2016).

Segundo Segundo Brandelli, Daroit e Corrêa (2015), o estudo da determinação de peptídeos antifúngicos a partir da hidrólise de soroproteínas tem sido pouco explorado. Desta

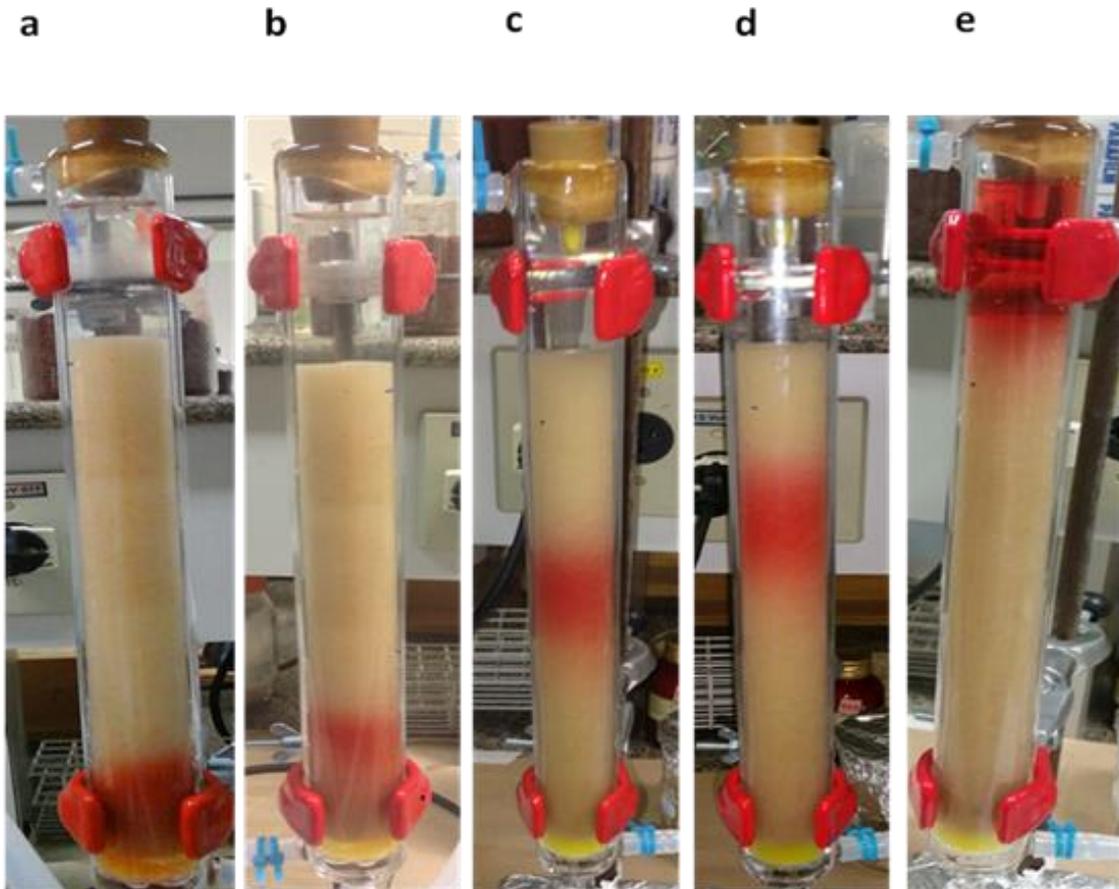
forma, o trabalho atual representa uma perspectiva interessante de obtenção destes compostos e, portanto, novos estudos que envolvam uma maior exploração podem ser realizados futuramente como a determinação da sequência de aminoácidos, a síntese, bem como a avaliação da citotoxicidade desses peptídeos.

#### **4.7 Reator de leito empacotado: sistema contínuo**

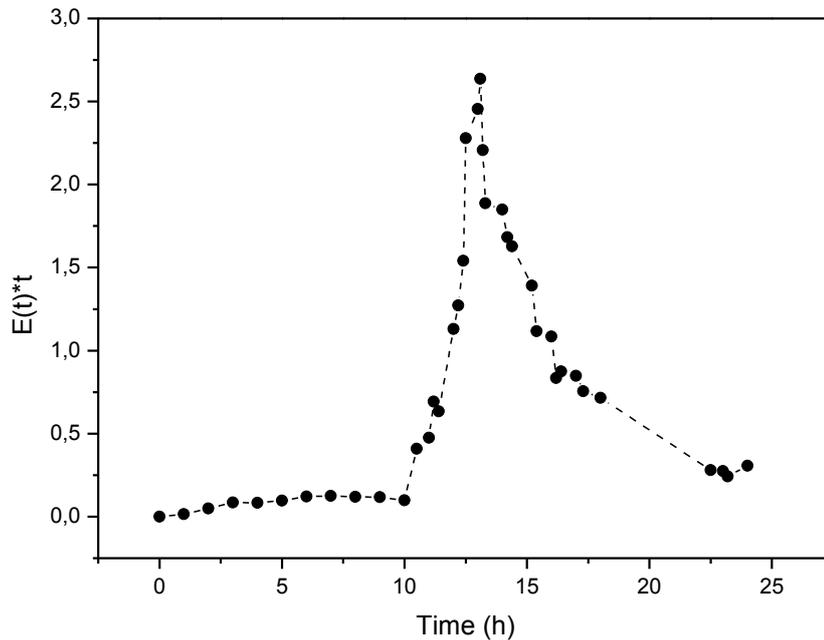
##### **4.7.1 Caracterização hidrodinâmica do sistema PBR**

O teste do traçador foi realizado para analisar o comportamento hidrodinâmico do reator PBR. A Figura 30 apresenta uma ilustração de diferentes tempos de análise durante a execução do teste de traçador do tipo pulso visando uma caracterização hidrodinâmica do reator de leito empacotado. A partir de dados experimentais (Equação 4), foi possível a construção da curva  $E(t)$  que mostra a distribuição do tempo de residência em função do tempo do ensaio (Figura 31). Usando a Equação 5, o tempo médio de residência foi calculado como 12,9 h. De acordo com as condições experimentais, esse valor foi aproximadamente 19% maior do que o tempo espacial (10,8 h). Portanto, considerando os erros experimentais comuns envolvidos neste tipo de ensaio, pode-se dizer que a formação de caminhos preferenciais foi mínima.

**Figura 30.** Teste de traçador do tipo pulso visando-se à caracterização hidrodinâmica do reator de leito empacotado em diferentes tempos, em que **a**= tempo inicial correspondente à injeção do traçador; **(b)**, **(c)** e **(d)**= tempos intermediários; **(e)**= final do experimento.



**Figura 31.** Curva E (t) de distribuição do tempo de residência em função do tempo de ensaio.



#### 4.7.2 Caracterização dos hidrolisados proteicos obtidos em sistema contínuo

##### 4.7.2.1 Grau de hidrólise (GH)

Os resultados do grau de hidrólise obtidos neste trabalho usando PBR são apresentados na Figura 32. O GH variou de 58,98 à 70,70% durante 180 horas. No estado estacionário (a partir de 30h de reação) o GH médio obtido foi de  $63,9 \pm 4,02$  %. Estes valores podem ser considerados satisfatórios quando comparados com a literatura (Tabela 11). Este resultado é 1,7 vezes superior ao GH obtido Tang et al. (2009), que foi de 38,5%. Porém, neste caso, os autores empregaram alcalase® na forma livre, em batelada.

Esta discrepância entre o valor obtido ( $63,9 \pm 4,02$  %) e os demais autores pode ser explicada pela utilização do reator contínuo que foi capaz de aumentar a eficiência da hidrólise das soroproteínas, pois de acordo com Carrasco-Castilla et al. (2012), reatores contínuos são mais eficientes na produção industrial de peptídeos bioativos e menos onerosos do que os processos em bateladas.

De acordo com a Tabela 11, Pedroche et al. (2007) alcançaram um GH de 36% empregando enzimas imobilizadas em glioxil-agarose. Salienta-se que os autores também efetuaram a reação em batelada. Além deste resultado, podem ser observados valores de GH em torno de 25% (Zhang et al., 2010; Zheng et al., 2008; Pessato et al., 2016). Nestes

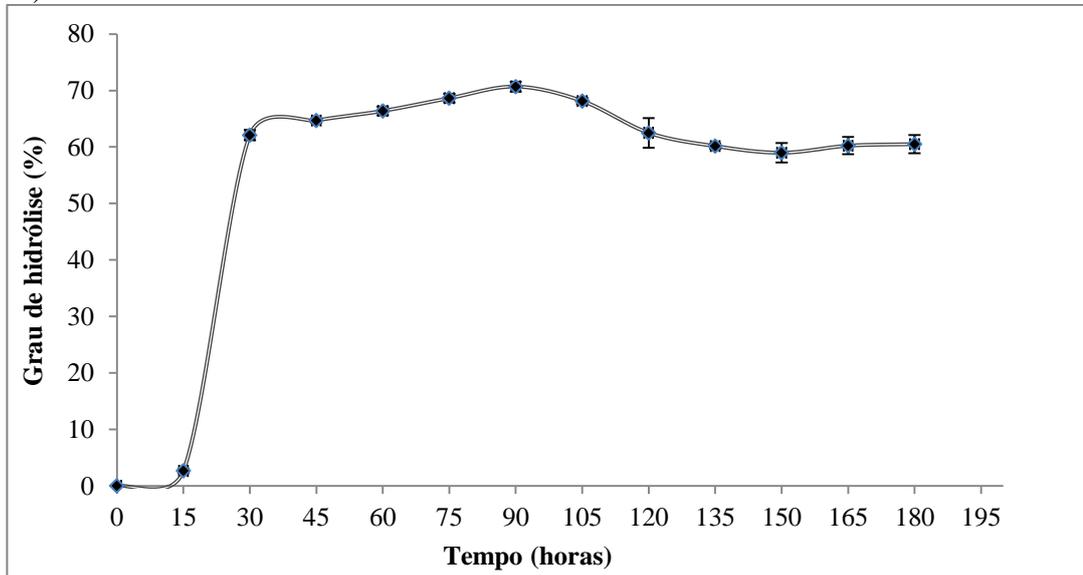
trabalhos, os autores empregaram enzimas na forma livre e reatores operando em modo batelada. Finalmente, Bassan et al. (2016) obtiveram GH de 23%, empregando tripsina imobilizada em Glioxil-SM e reator de leito fixo. Salienta-se que este é um trabalho de nosso grupo de pesquisa. Não foi encontrado na literatura, relatos de outros autores empregando reatores contínuos para a hidrólise de proteínas do soro. Portanto, este trabalho representa o desenvolvimento de um processo inovador e eficiente, pois foi capaz de promover uma alta clivagem das ligações peptídicas presentes nas proteínas do soro de queijo, possibilitando a obtenção de peptídeos bioativos com a utilização do derivado de baixo custo AGSM.

**Tabela 11.** Diferentes resultados de grau de hidrólise encontrados na literatura.

Enzima	Substrato	Suporte	Reator	Grau de hidrólise (%)	Tipo de produto	Referência
Alcalase® solúvel	Proteínas do soro do leite	---	---	19,3-38,5	Hidrolisados proteicos com potencial antioxidante	Tang et al., (2010)
Protease solúvel	Proteínas de arroz	---	---	2,01-23,23	Peptídeos antioxidantes	Zhang et al., (2010)
Pepsina, tripsina e quimotripsina solúveis	Proteínas do soro do leite	---	---	3,7-12	Peptídeos antimicrobianos	Théolier et al., (2013)
Tripsina, quimotripsina e carboxipeptidase A imobilizadas	Proteínas de <i>Brassica carinata</i>	Glioxil-agarose	---	36	Peptídeos anti-hipertensivos e hipocolesterômicos	Pedroche et al., (2007)
Protease bacteriana solúvel	Proteínas do soro do leite	---	Reator de membrana em tanque agitado contínuo	23	Hidrolisados hipoalergênicos	Guadix et al., (2006)
Alcalase® solúvel	$\alpha$ -La e $\beta$ -Lg	---	---	13,6	Hidrolisados proteicos quelantes de ferro	Kim et al., (2007)
Alcalase® solúvel	Proteínas do soro do leite	---	---	20	Hidrolisados proteicos redutores da antigenicidade das soroproteínas	Zheng et al., (2008)
Termolisina solúvel	Proteína da clara de ovo	---	---	0-25	Peptídeos anti-hipertensivos	Lei et al., (2011)
Alcalase® imobilizada	Proteína da carne de frango	Glioxil-agarose	---	1-10	Hidrolisados proteicos com propriedades funcionais melhoradas	Yust et al., (2010)
Alcalase® imobilizada	Isolado proteico do soro de leite	Glioxil-agarose	---	9,5-22	Hidrolisados hipoalergênicos	Pessato et al., (2016)
Tripsina imobilizada	Proteínas do soro de queijo	Glioxil-SM	PBR	23	Peptídeos bioativos	Bassan et al., (2016)
Alcalase® imobilizada	Proteínas do soro de queijo	Glioxil-SM	PBR	63,9	Peptídeos bioativos	Neste trabalho

--- Não especificado pelos autores.

**Figura 32.** Grau de hidrólise obtido pela hidrólise das soroproteínas em sistema contínuo utilizando o derivado AGSM em diferentes tempos de reação. Utilizou-se reator de vidro encamisado PBR (diâmetro interno= 2 cm e h= 22,5 cm; volume útil= 65 mL; T= 50°C; vazão= 6mL.h<sup>-1</sup>; massa= 25 g de AGSM).

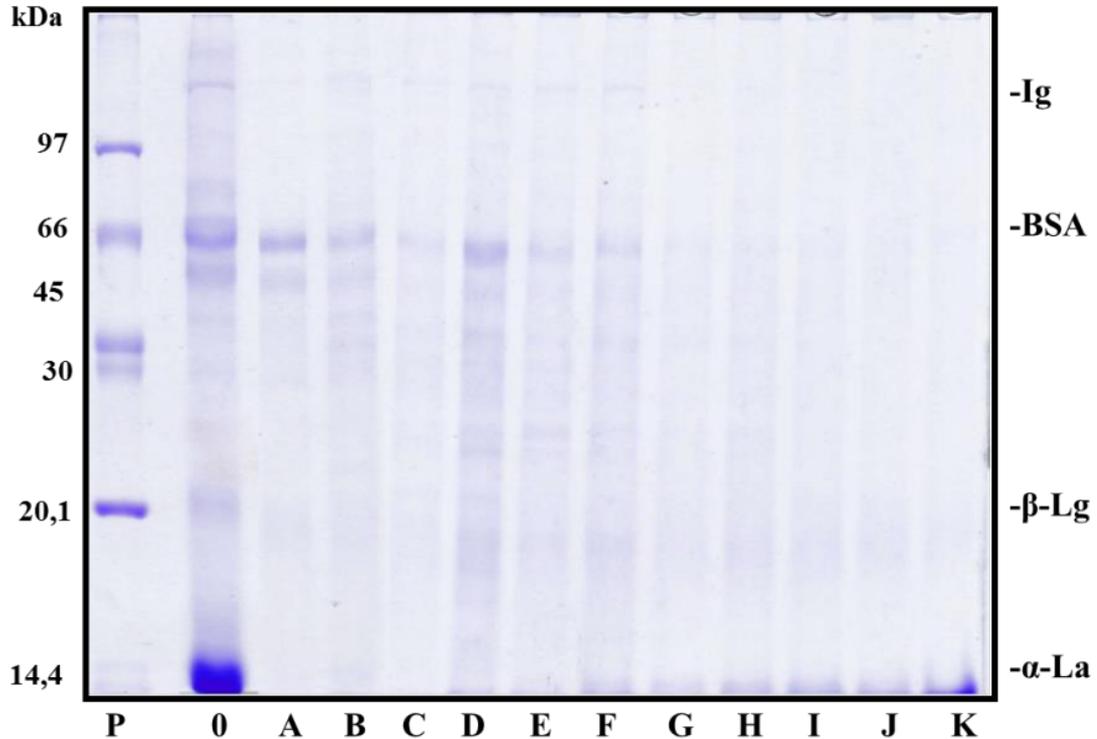


#### 4.7.2.2 SDS-PAGE e RP-HPLC

A confirmação da hidrólise das proteínas do soro de queijo utilizando AGSM em PBR pode ser observada nas Figuras 33 e 34, que mostram o perfil eletroforético e cromatográfico respectivamente.

Observando a SDS-PAGE (Figura 33), a raia 0 representa as proteínas do soro antes do processo de hidrólise e as raias de (A-K) demonstram os hidrolisados proteicos obtidos nos tempos respectivos de (30-180 horas). Como é possível visualizar, ocorreu a diminuição e/ou desaparecimento da coloração das bandas proteicas no decorrer do tempo, indicando, desta forma, que houve a quebra das ligações peptídicas e, portanto que a hidrólise de todas as proteínas presentes no soro foi bem-sucedida.

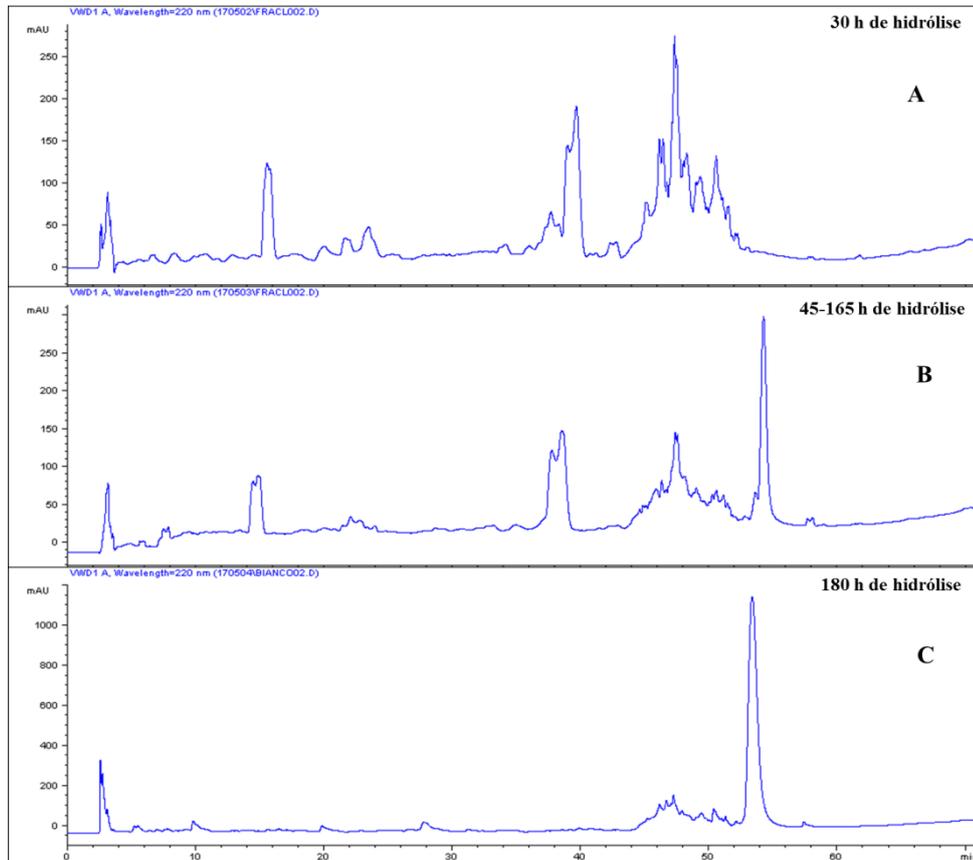
**Figura 33.** SDS-PAGE 12%: perfil eletroforético do soro de queijo bovino e hidrolisados proteicos obtidos com AGSM em PBR. (P) padrões de massa molar; (0) SQB. Tempo em horas de hidrólise no reator: (A) 30; (B) 45; (C): 60; (D): 75; (E): 90; (F): 105; (G): 120; (H): 135; (I): 150; (J): 165; (K): 180. Ig: imunoglobulina; BSA: albumina de soro bovino;  $\alpha$ -La: alfa-lactalbumina;  $\beta$ -Lg: beta-lactoglobulina.



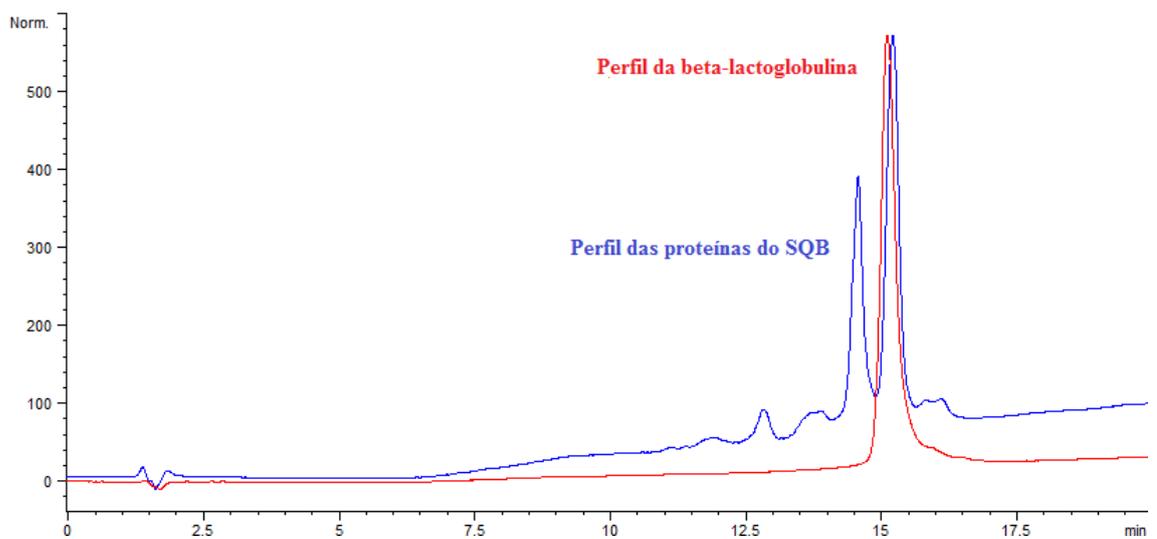
Analisando a Figura 34 é possível constatar a hidrólise das soroproteínas por meio do perfil cromatográfico obtido em diferentes tempos de ensaio. Os picos formados são derivados principalmente da hidrólise da alfa-lactalbumina e beta-lactoglobulina, principais proteínas encontradas no SQB. Fato confirmado pela Figura 35 onde é mostrado o perfil RP-HPLC da beta-lactoglobulina e comparado com o perfil do SQB. A sobreposição dos picos indica que uma das soroproteínas presentes no soro é a beta-lactoglobulina.

É possível perceber que o perfil eletroforético dos produtos de hidrólise obtidos por AGSM em RB (Figura 22) foram diferentes dos produzidos por PBR (Figura 33). Em PBR, houve a clivagem das soroproteínas incluindo Ig e SBA, fato não observado em RB. Desta forma, pode-se dizer que o reator de leito empacotado empregado neste estudo foi capaz de aumentar a eficiência de hidrólise das proteínas do SQB.

**Figura 34.** RP-HPLC de hidrolisados proteicos obtidos com AGSM em sistema contínuo após diferentes tempos de hidrólise. **A= 30h; B= 45-165h e C= 180 h.**



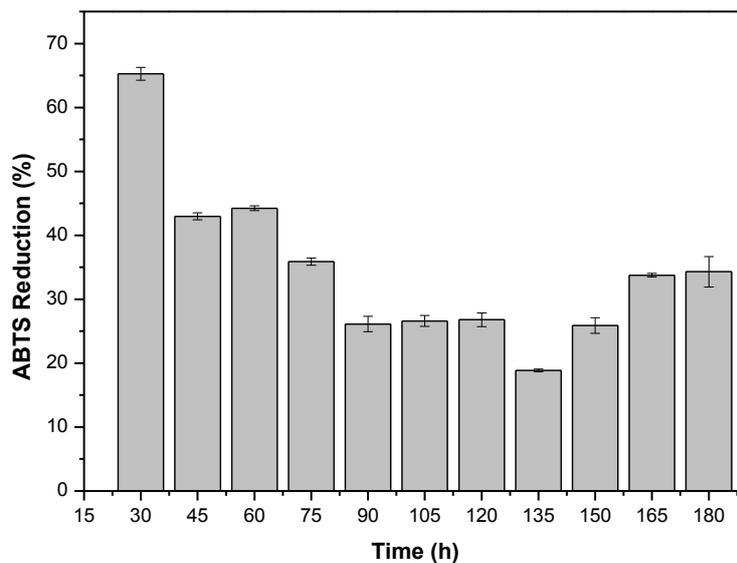
**Figura 35.** RP-HPLC das proteínas do SQB e da beta-lactoglobulina ( $\beta$ -Lg).



#### 4.7.2.3 ABTS

É possível observar na Figura 36 que os hidrolisados proteicos do soro obtidos por AGSM em PBR apresentaram um elevado potencial antioxidante. Houve pequena variação deste potencial durante o intervalo de 30-180 h que pode estar relacionada com a estabilidade dos peptídeos formados, uma vez que o processo PBR esteve em funcionamento durante o longo período de 180 horas seguidas. Segundo Liu et al. (2017), os efeitos de temperatura, pH, intensidade luminosa e condições de armazenamento podem interferir na determinação da atividade antioxidante de peptídeos. Cabe-se ressaltar que a capacidade de redução do radical ABTS após 180 horas (34,30%) apresentou atividade antioxidante superior a 50% de seu valor inicial em 30 horas (65,27%).

**Figura 36.** Atividade antioxidante de hidrolisados proteicos do soro obtidos por AGSM utilizando PBR em diferentes tempos de hidrólise.



#### 4.7.2.4 Análise MALDI-TOF

O produto obtido por AGSM em PBR após 180 horas de hidrólise foi submetido à análise por MALDI-TOF e foram identificados peptídeos com massa molecular variando de 146,089 à 2533,388 Da. Isto indica que a hidrólise das proteínas do soro de queijo utilizando AGSM no reator desenvolvido neste trabalho foi bastante eficaz e capaz de produzir peptídeos de massa molecular (<2600 m/z). É importante salientar que as soroproteínas do queijo bovino utilizadas como substrato neste trabalho apresentam alta massa molecular (14 à 1000 kDa) e

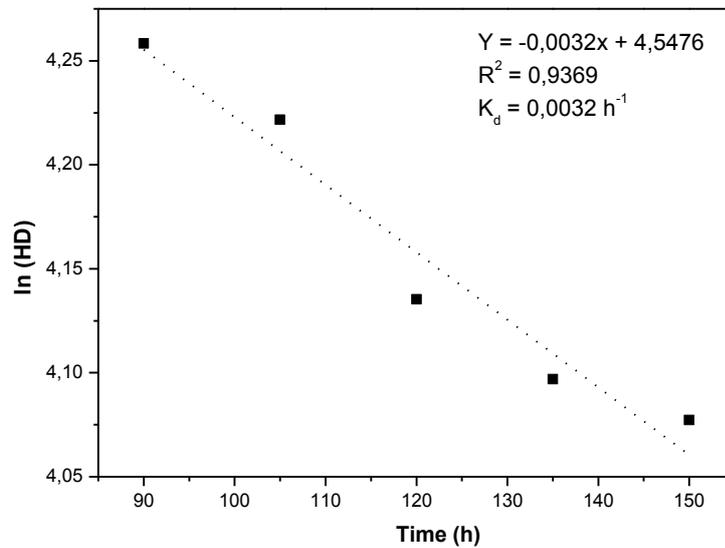
que, após a hidrólise houve grande redução no tamanho destas moléculas ( $< 2600$  m/z), além disso, o método empregado foi capaz de obter compostos com alto potencial antioxidante. Segundo Power, Jakeman e Fitzgerald (2013), peptídeos bioativos contêm normalmente de 2 à 20 resíduos de aminoácidos e massa molecular  $< 6000$  Da. Tang et al. (2009) estudaram a hidrólise do isolado proteico do soro utilizando a alcalase® e produziram hidrolisados proteicos com alta capacidade antioxidante e além disso, os autores observaram que a fração proteica de baixa massa molecular (0,1-2,8 kDa) apresentou o maior potencial antioxidante.

#### 4.7.2.5 Estabilidade operacional

Quando se trata de aplicação de enzimas imobilizadas em reatores, um parâmetro de grande importância a ser avaliado é a estabilidade operacional. Este parâmetro está relacionado ao grau de interação enzima-suporte, obstrução dos poros do suporte, entre outros fatores (PAULA et al., 2011). De qualquer forma, em reatores contínuos, espera-se que o derivado imobilizado apresente alta estabilidade, a fim de tornar sua aplicação viável em termos industriais. Neste trabalho, os dados de grau de hidrólise no estado estacionário, foram linearizados, de acordo com a equação 7, e ajustado a um modelo de desativação de primeira ordem (Figura 37).

A partir do coeficiente angular da reta mostrado na Figura 37, calculou-se o valor de  $k_d$  ( $0,032$  h<sup>-1</sup>) e o tempo de meia-vida do biocatalisador (Equação 8) foi estimado em 246 h ou 10 dias. Desta forma, a alta estabilidade operacional mostrada pelo derivado AGSM em sistema contínuo utilizando PBR pode ser adequada para futuras aplicações industriais. Isto pode ser atribuído ao procedimento de imobilização aplicado a esta enzima.

**Figura 37.** Linearização do grau de hidrólise em função do tempo de reação no estado estacionário.



## 5. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados mostram que foi possível imobilizar a alcalase® em suporte glioxil-SM com eficientes rendimento de imobilização, atividade recuperada e fator de estabilidade. O derivado estável AGSM foi utilizado com bastante êxito para a hidrólise das proteínas do soro de queijo bovino tanto para o sistema descontínuo quanto para o sistema contínuo empregado. Nos dois processos realizados foi possível a obtenção de peptídeos bioativos.

A hidrólise das proteínas do soro de queijo utilizando o derivado AGSM representa uma forma viável, de baixo custo, que contribui para a melhoria do meio ambiente pela reutilização de resíduos industriais e formação de peptídeos bioativos. O sistema descontínuo aplicado possibilitou a obtenção de peptídeos com expressiva atividade antioxidante, alta capacidade quelante de ferro e elevada atividade antimicrobiana. Esses peptídeos podem ser usados em futuros estudos para obtenção de quelatos  $\text{Fe}^{2+}$ -peptídeos na fortificação de alimentos com o intuito de aumentar a biodisponibilidade do ferro, além de propiciar a redução de seus efeitos pró-oxidantes e elevar a capacidade antimicrobiana. Ademais, a atividade antioxidante e antimicrobiana destes peptídeos também representa um atrativo potencial para a indústria farmacêutica como alvo de pesquisas e elaboração de novos produtos cosméticos e farmacológicos.

O reator de leite empacotado contendo o derivado AGSM foi desenvolvido com muito sucesso, pois tornou-se possível o reaproveitamento do soro do queijo bovino para a hidrólise das soroproteínas em sistema contínuo e obtenção de peptídeos bioativos. A caracterização hidrodinâmica do sistema foi feita e a formação de caminho preferencial pelo leite foi mínima. O vigente processo ocorreu com elevado grau de hidrólise e os peptídeos formados apresentaram alta capacidade antioxidante. Estes resultados demonstram que o atual processo utilizado é muito eficiente para o reuso do soro e obtenção de peptídeos antioxidantes. Além disso, pode ser uma estratégia viável para a indústria de alimentos e farmacêutica, pois possibilita o tratamento e reutilização do soro além da aplicação de peptídeos antioxidantes na formulação de novos produtos.

O presente trabalho representa uma perspectiva interessante para a obtenção de peptídeos bioativos e, portanto, futuros estudos que envolvam uma maior exploração podem ser realizados como a determinação da sequência de aminoácidos, a síntese, além da avaliação da citotoxicidade desses peptídeos.

## REFERÊNCIAS

- ABEYRATHNE, E. D. N. S. et al. Enzymatic hydrolysis of ovomucin and the functional and structural characteristics of peptides in the hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 192, p. 107-113, 2016.
- ADAMSON, N. J.; REYNOLDS, E. C. Characterization of casein phosphopeptides prepared using alcalase: determination of enzyme specificity. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, p. 202-207, 1996.
- ADLER-NISSEN, J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 27, n. 6, p. 1256-1262, 1979.
- ARAGON, C. C. **Imobilização multipontual covalente de xilanases: seleção de derivados ativos e estabilizados**. 2013. 119 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2013.
- ARAGON, C. C. et al. Continuous production of xylooligosaccharides in a packed bed reactor with immobilized–stabilized biocatalysts of xylanase from *Aspergillus versicolor*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 98, p. 8-14, 2013.
- ARROYO, M. Inmovilización de enzimas: fundamentos, métodos y aplicaciones. **Ars Pharmaceutica**, v. 39, n. 2, p. 23-39, 1998.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NUTRIÇÃO. Carboidrato obtido do soro de leite aumenta imunidade disponível em: < [http:// http://www.asbran.org.br](http://www.asbran.org.br)> Acesso em: 12 jul. 2016.
- ASHMEAD, H. D. The absorption and metabolism of iron amino acid chelate. **Archivos latinoamericanos de Nutricion**, v. 51, p. 13-21, 2001. Suppl. 1.
- BASSAN, J. **Hidrolisados parciais de soroproteínas lácteas bovina e bubalina obtidos com proteases imobilizadas: ensaios de transporte e absorção de peptídeos através das técnicas da dialisabilidade e cultura de células Caco-2**. 2015. 131 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2015.
- BASSAN, J. C. et al. Buffalo cheese whey proteins, identification of a 24 kDa protein and characterization of their hydrolysates: in vitro gastrointestinal digestion. **PloS One**, v. 10, n. 10, 2015.
- BASSAN, J. C. et al. Immobilization of trypsin in lignocellulosic waste material to produce peptides with bioactive potential from whey protein. **Materials**, v. 9, n. 5, 2016.
- BENUCCI, I. et al. Immobilised native plant cysteine proteases: packed-bed reactor for white wine protein stabilisation. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 2, p. 1130-1139, 2016.

- BEZERRA, T. M. S. et al. Covalent immobilization of laccase in green coconut fiber and use in clarification of apple juice. **Process Biochemistry**, v. 50, p. 417-23, 2015.
- BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. cap. 6. p.124-147.
- 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, p. 248-254, 1976.
- BRANDELLI, A.; DAROIT, D. J.; CORRÊA, A. P. F. Whey as a source of peptides with remarkable biological activities. **Food Research International**, v. 73, p. 149-161, 2015.
- BRÍGIDA, A.I.S.; PINHEIRO, A.D.T.; FERREIRA, A.L.O.; GONÇALVES, L.R.B. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by covalente attachment to green coconut fiber. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, vol. 136, p. 67-80, 2007.
- BRÍGIDA, A. I. S. et al. Immobilization of *Candida Antarctica* lipase B by adsorption to green coconut fiber. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 146, p. 173-187, 2008.
- CACCAVALE, F. et al. **Control and monitoring of chemical batch reactors**. London: Springer Verlog, 2011. (Advances in industrial control).
- CARVALHO, L. A.; MACHINI, M. T. Hemocidinas derivadas da hemoglobina: estruturas, propriedades e perspectivas. **Química Nova**, v. 7, p. 1021-1029, 2013.
- CARRASCO-CASTILLA, J. et al. Use of proteomics and peptidomics methods in food bioactive peptide science and engineering. **Food Engineering Reviews**, v. 4, n. 4, p. 224-243, 2012.
- CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Biologically active peptides: processes for their generation, purification and identification and applications as natural additives in the food and pharmaceutical industries. **Food Research International**, v. 74, p. 185-198, 2015.
- CLÉMENT, M. et al. Whey-derived free fatty acids suppress the germination of *Candida albicans* in vitro. **FEMS Yeast Research**, v. 7, n. 2, p. 276-285, 2007.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standards- 6th ed. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/servicos/aude/manuais/clsi.asp>> Acesso em 21 nov. 2017.
- COELHO, M. A. Z.; SALGADO, A. M.; RIBEIRO, B. D. **Tecnologia enzimática**, Rio de Janeiro: EPUB, 2008, 288 p.
- COLOWICH, S. P.; KAPLAN, N. O. Methods in enzymology, v. 19: Proteolytic enzymes. New York: Academic Press Inc., 1970.

CONWAY, V.; GAUTHIER, S. F.; POULIOT, Y. Antioxidant activities of buttermilk proteins, whey proteins, and their enzymatic hydrolysates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 364-372, 2013.

CORÍCI, L. N. et al. Sol-gel immobilization of alcalase from *Bacillus licheniformis* for application in the synthesis of C-terminal peptide amides. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 73, n. 1, p. 90-97, 2011.

CORRÊA, A. P. S. **Obtenção de peptídeos bioativos a partir da hidrólise enzimática de caseinato ovino e soro de queijo ovino**. 2013. 103 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

COSTA, D. M. **Sabugo de milho como suporte para imobilização de lipase**. 2015. 157 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos) - Universidade Tiradentes, Aracaju, 2015.

COSTA-SILVA, T. A. et al. Drying of enzyme immobilized on eco-friendly supports. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 44, p. 3019-3026, 2015.

CUSTÓDIO, M. F. **Hidrólise enzimática das proteínas do soro de queijo: caracterização cinética e condições ótimas de pH e temperatura**. 2001. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2001.

DATTA, S.; CHRISTENA, L. R.; RAJARAM, Y. R. S. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. **3 Biotech**, v. 3, n. 1, p. 1-9, 2013.

DEMERS-MATHIEU, V. et al. Antibacterial activity of peptides extracted from tryptic hydrolyzate of whey protein by nanofiltration. **International Dairy Journal**, v. 28, p. 94-101, 2013.

DRYÁKOVÁ, A. et al. Antioxidant properties of whey protein hydrolysates as measured by three methods. **European Food Research and Technology**, v. 230, n. 6, p. 865-874, 2010.

D'SOUZA, S. F.; GODBOLE, S. S. Immobilization of invertase on rice husk using olyethylenimine. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 52, p. 59-62, 2002.

DUARTE, J. M. W. N. **Imobilização de protease de *Penicillium aurantiogriseum* URM4622 em nanopartículas magnéticas e sua aplicação na produção de peptídeos com atividade antioxidante**. 2014. 103 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Aplicada à Saúde) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.

EL-ZAHAR, K. et al. Antimicrobial activity of ovine whey protein and their peptic hydrolysates. **Milchwissenschaft**, v. 59, n. 11, p. 653-656, 2004.

EŞ, I.; VIEIRA, J. D. G.; AMARAL, A. C. Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 5, p. 2065-2082, 2015.

FERNANDES, P.; FERREIRA, B. S.; CABRAL, J. M. S. Reactores enzimáticos multifásicos. In: CABRAL, J. M. S.; AIRES-BARROS, M. R.; GAMA, M. **Engenharia enzimática**. Lisboa: Lidel, 2003, Cap. 8, p. 189-208.

FERREIRA, L. et al. Influence of different silica derivatives in the immobilization and stabilization of a *Bacillus licheniformis* protease (Subtilisin Carlsberg). **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 21, p. 189-199, 2003.

FOGLER, H. S. **Elementos de engenharia das reações químicas**. 4 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2009. 853 p.

FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; McSWEENEY, P. L. Whey and whey products. In: \_\_\_\_\_. **Fundamentals of cheese science**. 2nd ed. New York: Springer, c2017. p. 755-769.

GALÁRRAGA, V. J. C. et al. Bromofenol blue discoloration using peroxidase immobilized on highly activated corn cob powder. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 3, p. 321-326, 2013.

GARIBOTTO, F. M. et al. New small-size peptides possessing antifungal activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 1, p. 158-167, 2010.

GIRGIH, A. T. et al. Antioxidant properties of Salmon (*Salmo salar*) protein hydrolysate and peptide fractions isolated by reverse-phase HPLC. **Food Research International**, v. 52, n. 1, p. 315-322, 2013.

GOBBA, D. C. et al. Antioxidant peptides from goat milk protein fractions hydrolysed by two commercial proteases. **International Dairy Journal**, v. 39, n. 1, p. 28-40, 2014.

GOBBETTI, M. et al. Latent bioactive peptides in milk proteins: proteolytic activation and significance in dairy processing. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 42, n. 3, p. 223-239, 2002.

GRAZÚ, V. et al. Promotion of multipoint covalent immobilization through different regions of genetically modified penicillin G acylase from *E. coli*. **Journal Process Biochemistry**, v. 45, p. 390-398, 2010.

GUADIX, A.; CAMACHO, F.; GUADIX, E. M. Production of whey protein hydrolysates with reduced allergenicity in a stable membrane reactor. **Journal of Food Engineering**, v. 72, n. 4, p. 398-405, 2006.

GUDIÑA, E. J. et al. 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.

GUISÁN, J. M. Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, n. 6, p. 375-82, 1988.

GUISÁN, J. M. et al. Immobilization of enzymes on glyoxyl-agarose: strategies for enzyme stabilization by multipoint attachment. In: BICKERSTAFF, G. F. (Ed). **Immobilization of enzymes and cells**. Totowa: Humana Press, 1997. p. 289-298.

GUISÁN, J. M. (Ed). **Immobilization of enzymes and cells**. 2 nd ed. Totowa: Humana Press, 2006. 449 p.

HAN, J. et al. Antifungal activity and action mechanism of histatin 5-halocidin hybrid peptides against *Candida* ssp. **PloS One**, v. 11, n. 2, 2016.

HARAGUCHI, F. K.; ABREU, W. C.; PAULA, H. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Revista de Nutrição**, n. 19, v. 4, p. 479-488, 2006.

HEGEDUS, N.; MARX, F. Antifungal proteins: more than antimicrobials? **Fungal Biology Reviews**, v. 26, p. 132-145, 2013.

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; RECIO, I.; AMIGO, L.  $\beta$ -lactoglobulin as source of bioactive peptides. **Amino acids**, v. 35, n. 2, p. 257-265, 2008.

HÖRNER, M. et al. Triazenos e atividade antibacteriana. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 3, p. 441-449, 2008.

KIM, S. B. et al. Separation of iron-binding protein from whey through enzymatic hydrolysis. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 625–631, 2007.

KOSSEVA, M. R. et al. Use of immobilised biocatalysts in the processing of cheese whey. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 45, n. 5, p. 437-447, 2009.

KUKMAN, I. L.; ZELENIK-BLATNIK, M.; ABRAN, V. Isolation of low-molecular-mass hydrophobic bitter peptides in soybean protein hydrolysates by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 704, p. 113-120, 1995.

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, p. 438-443, 2009.

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

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

LI, H.; ALUKO, R. E. Identification and inhibitory properties of multifunctional peptides from pea protein hydrolysate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 21, p. 11471-11476, 2010.

LIMA, D. C. A. **Estudo comparativo da atividade antioxidante de plantas medicinais da caatinga utilizadas como antiinflamatórias**. 2011. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.

- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LEI, B. et al. Effect of sonication on thermolysin hydrolysis of ovotransferrin. **Food Chemistry**, v. 124, n. 3, p. 808-815, 2011.
- LIU, Y. et al. Antioxidant activity and stability study of peptides from enzymatically hydrolyzed male silkworm. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 41, n. 1, 2017.
- LÓPEZ-GALLEGU, F. et al. Stabilization of enzymes by multipoint covalent immobilization on supports activated with glyoxyl groups. **Immobilization of Enzymes and Cells: Third Edition**, 59-71.
- LORENZONI, A. S. G. et al. Continuous production of fructooligosaccharides and invert sugar by chitosan immobilized enzymes: comparison between in fluidized and packed bed reactors. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 111, p. 51-55, 2015.
- MADUREIRA, A. R. et al. Bovine whey proteins-overview on their main biological properties. **Food Research International**, v. 40, n. 10, p. 1197-1211, 2007.
- MAHMOUD, D. A. R. Immobilization of invertase by a new economical method using wood sawdust waste. **Journal Australian Basic and Applied**, v. 1, p. 364-372, 2007.
- MANN, B. et al. Antioxidant activity of whey protein hydrolysates in milk beverage system. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 6, p. 3235-3241, 2015.
- MARQUES, D. P. **Separação e hidrólise das proteínas no soro de queijo**: alternativas para o reaproveitamento deste resíduo. 2005. 82 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.
- MARQUES, D. P. **Produção e aplicação de hidrolisado de proteínas do soro de queijo bovino no preparo de suplemento nutricional: minimização da sarcopenia em ratos idosos**. 2009. 132 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.
- MATEO, C. et al. Glyoxyl agarose: a fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 274-280, 2006.
- MATEO, C. et al. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p. 1451-1463, 2007.
- MATEO, C. et al. Improvement of enzyme properties with a two-step immobilization process on novel heterofunctional supports. **Biomacromolecules**, v. 11, n.11, p. 3112-3117, 2010.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

MÖLLER, N. P. et al. Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. **European Journal of Nutrition**, v. 47, n. 4, p. 171-182, 2008.

MONSAN, P.; COMBES, D. Application of immobilized invertase to continuous hydrolysis of concentrated sucrose solutions. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 26, n. 4, p. 347-351, 1984.

NAGHMOUCHI, K.; DRIDER, D.; FLISS, I. Action of divergicin M35, a class IIa bacteriocin, on liposomes and *Listeria*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, n. 6, p. 1508-1517, 2007.

NAGPAL, R. et al. Bioactive peptides derived from milk proteins and their health beneficial potentials: an update. **Food and Function**, v. 2, p. 18-27, 2011.

NAJAFIAN, L.; BABJI, A. S. Production of bioactive peptides using enzymatic hydrolysis and identification antioxidative peptides from patin (*Pangasius sutchi*) sarcoplasmic protein hydrolysate. **Journal of Functional Foods**, v. 9, p. 280-289, 2014.

NELSON, D. L.; LEHNINGER, A. L.; COX, M. M. **Lehninger. Principles of biochemistry**. 5 th ed. New York: W. H. Freeman, Macmillan, 2008.

NEVELL, T. P. Methods in carbohydrate chemistry. In: WHISTLER, B. (Ed.). New York: Academic Press; 1963. p. 210-25.

ORTIZ-CHAO, P. et al. Production of novel ACE inhibitory peptides from  $\beta$ -lactoglobulin using protease N amano. **International Dairy Journal**, v. 19, n. 2, p. 69-76, 2009.

PAULA, A. V. **Reestruturação da gordura de leite por interesterificação enzimática empregando lipase imobilizada**: otimização das condições reacionais e operacionais. 2011. 212 f. Tese de Doutorado (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de Lorena, Lorena, 2011.

PAULA, A. V. et al. Interesterification of milkfat with soybean oil catalysed by *Rhizopus oryzae* lipase immobilised on SiO<sub>2</sub>-PVA on packed bed reactor. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 46, n. 10, p. 2124-2130, 2011.

PEDROCHE, J. et al. Effect of the support and experimental conditions in the intensity of the multipoint covalent attachment of proteins on glyoxyl-agarose supports: correlation between enzyme-support linkages and thermal stability. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 5, p. 1160-1166, 2007.

PELLEGRINI, A. et al. Isolation and characterization of four bactericidal domains in the bovine  $\beta$ -lactoglobulin. **Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects**, v. 1526, p. 131-140, 2001.

PELLEGRINI, A. et al. Isolation and identification of three bactericidal domains in the bovine  $\alpha$ -lactalbumin molecule. **Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects**, v. 1426, p. 439-448, 1999.

PELLEGRINI, A. Antimicrobial peptides from food proteins. **Current Pharmaceutical Design**, v. 9, n. 16, p. 1225-1238, 2003.

PESSATO, T. B. **Hidrolisados de isolado proteico do soro de leite obtidos com alcalase livre e imobilizada**: caracterização e detecção de proteínas alergênicas. 2014. 93 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014.

PESSATO, T. et al. Whey protein isolate hydrolysates obtained with free and immobilized alkalase: characterization and detection of residual allergens. **Food Research International**, v. 83, p. 112-120, 2016.

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

PIU, L. D. et al. Exploitation of starch industry liquid by-product to produce bioactive peptides from rice hydrolyzed proteins. **Food Chemistry**, v. 155, p. 199-206, 2014.

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

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9, p. 1231-1237, 1999.

REMÓN, J.; GARCÍA, L.; ARAUZO, J. Cheese whey management by catalytic steam reforming and aqueous phase reforming. **Fuel Processing Technology**, v. 154, p. 66-81, 2016.

RIPOLLES, D. et al. Antibacterial activity of bovine milk lactoferrin and its hydrolysates prepared with pepsin, chymosin and microbial rennet against foodborne pathogen *Listeria monocytogenes*. **International Dairy Journal**, v. 45, p. 15-22, 2015.

RODRIGUES, D. S. et al. Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 51, n. 3, p. 100-109, 2008.

ROHLFES, A. L. B. et al. Aproveitamento de subproduto de agroindústrias do setor queijeiro para desenvolvimento de produtos alimentícios e redução de impacto ambiental. **Tecno-Lógica**, v. 18, n. 1, p. 13-18, 2014.

ROMÁM, A.; WANG, J.; CSANÁDI, J.; HODÚR, C.; VATAI, G. Experimental investigation of the sweet whey concentration by nanofiltration. **Food Bioprocess Technology**, v. 4, p. 702-709, 2011.

RUIZ-RUIZ, J. et al. Angiotensin i-converting enzyme inhibitory and antioxidant peptide fractions from hard-to-cook bean enzymatic hydrolysates. **Journal of Food Biochemistry**, v. 37, n. 1, p. 26-35, 2013.

RUTHERFURD-MARKWICK, K. J. Food proteins as a source of bioactive peptides with diverse functions. **British Journal of Nutrition**, v. 108, p. 149-157, 2012.

SADAT, L. et al. Isolation and identification of antioxidant peptides from bovine  $\alpha$ -lactalbumin. **International Dairy Journal**, v. 21, p. 214-221, 2011.

SANTAELLA, N.; CERRI, M. O.; PAULA, A. V. Caracterização hidrodinâmica de um reator de leite fluidizado e determinação da velocidade mínima de fluidização em função da massa de biocatalisador. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 12., 2017, São Carlos. Proceedings...Disponível em: <<https://www.proceedings.blucher.com.br/article-details/caracterizacao-hidrodinmica-de-um-reator-de-leito-fluidizado-e-determinao-da-velocidade-mnima-de-fluidizao-em-funo-da-massa-de-biocatalisador-25948>> Acesso em 21 nov. 2017.

SANTOS, M. H. D. et al. Influence of processing and roasting on the antioxidant activity of coffee (*Coffea arabica*). **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 604-610, 2007.

SANTOS, A. F. **Imobilização de invertase comercial e de *Saccharomyces cerevisiae* em sabugo de milho e bagaço de cana-de-açúcar**. 2010. 95 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

SALAMI, M. et al. Improvement of the antimicrobial and antioxidant activities of camel and bovine whey proteins by limited proteolysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 6, p. 3297-3302, 2010.

SARATH, G.; MOTTE, R. S. D. L.; WAGNER, F. W. Hemoglobin hydrolysis assay. Proteolytic Enzymes-A Practical Approach. Oxford IRL Press New York, USA.

SARMADI, B. H.; ISMAIL, A. Antioxidative peptides from food proteins: a review. **Peptides**, v. 31, n.10, p. 1949-1956, 2010.

SCATOLINO, M. V. et al. Use of maize cob for production of particleboard. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 37, n. 4, p. 330-337, 2013.

SCHMIDT, C. G.; SALAS-MELLADO, M. Influência da ação das enzimas alcalase e flavourzyme no grau de hidrólise das proteínas de carne de frango. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1144-1150, 2009.

SEE, S. F.; HOO, L. L.; BABJI, A. S. Optimization of enzymatic hydrolysis of salmon (*Salmo salar*) skin by alcalase. **International Food Research Journal**, v. 18, n. 4, p. 1359-1365, 2011.

SILVESTRE, M. P. C. et al. Analysis of whey protein hydrolysates: peptide profile and ACE inhibitory activity. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 4, 2012.

SILVA, M. E. C. **Avaliação do potencial quelante de ferro de hidrolisados proteicos de soro de leite obtidos com diferentes enzimas**. 2013. 96 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) - Faculdade de Engenharia de Alimentos Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.

SINHA, M. et al. Antimicrobial lactoferrin peptides: the hidden players in the protective function of a multifunctional protein. **International Journal of Peptides**, v. 2013, 2013.

SOUSA, C. P. Segurança alimentar e doenças veiculadas por alimentos: utilização do grupo coliforme como um dos indicadores de qualidade de alimentos. **Revista APS**, v. 9, n. 1, p. 83-88, 2006.

SOUZA, R. S. C. **Avaliação do potencial antioxidante e antimicrobiano de proteínas do soro de leite concentradas por membranas e hidrolisadas por diferentes enzimas comerciais**. 2013. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2013.

SOUZA, L. T. A. et al. Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte. In: Resende, R. R. (Urg.). **Biotecnologia aplicada à agro&indústria: fundamentos e aplicações**. São Paulo: Blucher, 2017. v. 4, cap. 15, p. 529-568.

SPADARO, A. C. A convenient manual trinitrobenzenesulfonic acid method for monitoring amino acids and peptides in chromatographic column effluents. **Analytical Biochemistry**, v. 96, n. 2, p. 317-321, 1979.

SPADOTI, L. M. et al. Peptídeos bioativos obtidos de proteínas do soro de queijo: potenciais ingredientes de alimentos promotores de saúde. **Fazer Melhor**, v. 1, p. 80-83, 2009.

SPELLMAN, D. et al. Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis. **International Dairy Journal**, v. 13, n. 6, p. 447-453, 2003.

TANG, C. H. et al. Physicochemical and antioxidant properties of buckwheat (*Fagopyrum esculentum Moench*) protein hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 115, n. 2, p. 672-678, 2009.

TARDIOLI, P.W. **Hidrólise controlada de proteínas do soro de queijo usando carboxipeptidase A e alcalase® imobilizadas multipontualmente em agarose**. 2003. 173 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2003.

TARDIOLI, P. W. et al. Hydrolysis of proteins by immobilized-stabilized alcalase-glyoxyl agarose. **Biotechnology Progress**, v. 19, n. 2, p. 352-360, 2003.

THÉOLIER, J. et al. Isolation and identification of antimicrobial peptides derived by peptic cleavage of whey protein isolate. **Journal of Functional Foods**, v. 5, p. 706-714, 2013.

UDENIGWE, C. C.; ALUKO, R. E. Multifunctional cationic peptide fractions from flaxseed protein hydrolysates. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 67, n. 1, p. 1-9, 2012.

URISTA, C. M. et al. Review: production and functionality of active peptides from milk. **Food Science and Technology International**, v. 17, n. 4, p. 293-317, 2011.

VIEIRA, D. C. **Imobilização da enzima  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* em agarose e quitosana utilizando diferentes protocolos de ativação**. 2009. 115 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

VOSENBERG, P. et al. Performance of alcalase formulations in near dry organic media: effect of enzyme hydration on dipeptide synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 78, p. 24-31, 2012.

ZHANG, Q. X. et al. Isolation and identification of antioxidant peptides derived from whey protein enzymatic hydrolysate by consecutive chromatography and Q-TOF MS. **Journal of Dairy Research**, v. 80, p. 367-373, 2010.

ZHANG, C.; XING, X.H. Enzyme bioreactors. In: MOO-YOUNG, M. (Ed). **Comprehensive biotechnology**. Amsterdam: Academic Press, 2011. v.2, chap.23, p. 319-329.

ZHENG, H. et al. Effects of pH, temperature and enzyme-to-substrate ratio on the antigenicity of whey protein hydrolysates prepared by alcalase. **International Dairy Journal**, v.18, n.10/11, p.1028-1033, 2008.

ZIGLIO, B. R. et al. Elaboração de pães com adição de farinha de sabugo de milho. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 9, n. 1, p. 115-128, 2009.

YADAV, J. S. S. et al. Cheese whey: a potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. **Biotechnology advances**, v. 33, n. 6, p. 756-774, 2015.

YOU, S. J. et al. Multifunctional peptides from egg white lysozyme. **Food Research International**, v. 43, n. 3, p. 848-855, 2010.

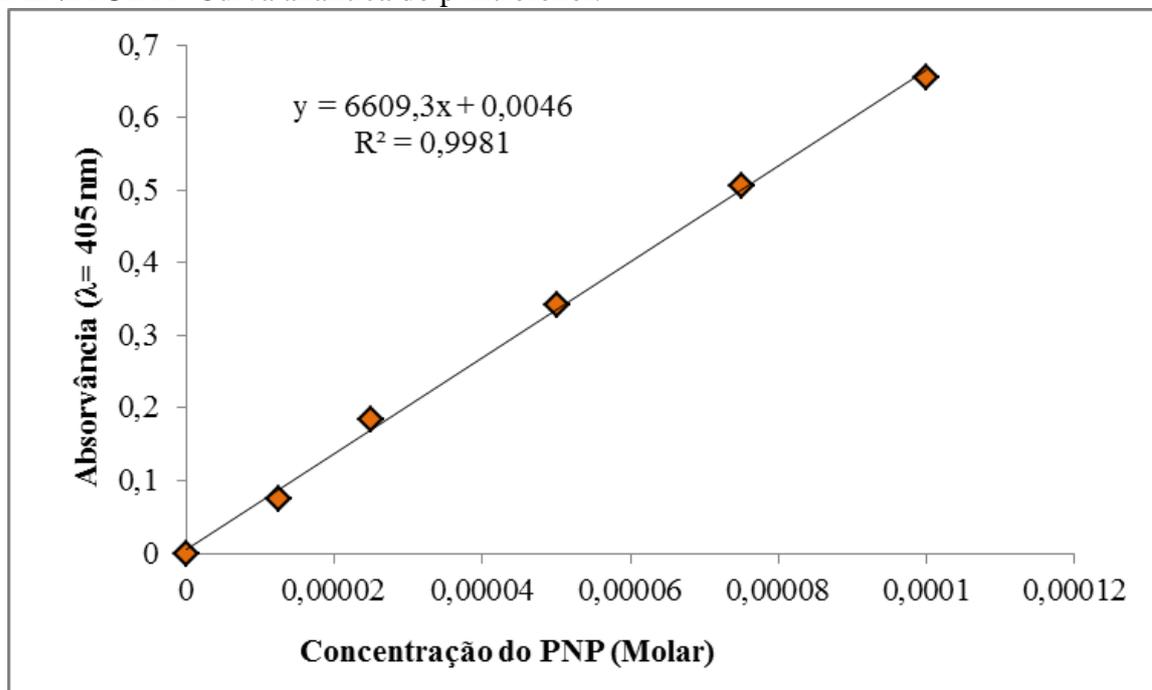
YUST, M. D. M. et al. Improvement of functional properties of chickpea proteins by hydrolysis with immobilised alcalase. **Food Chemistry**, v. 122, n. 4, p. 1212-1217, 2010.

WEI, J.-T.; CHIANG, B.-H. Bioactive peptide production by hydrolysis of porcine blood proteins in a continuous enzymatic membrane reactor. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 89, n. 3, p. 372-378, 2009.

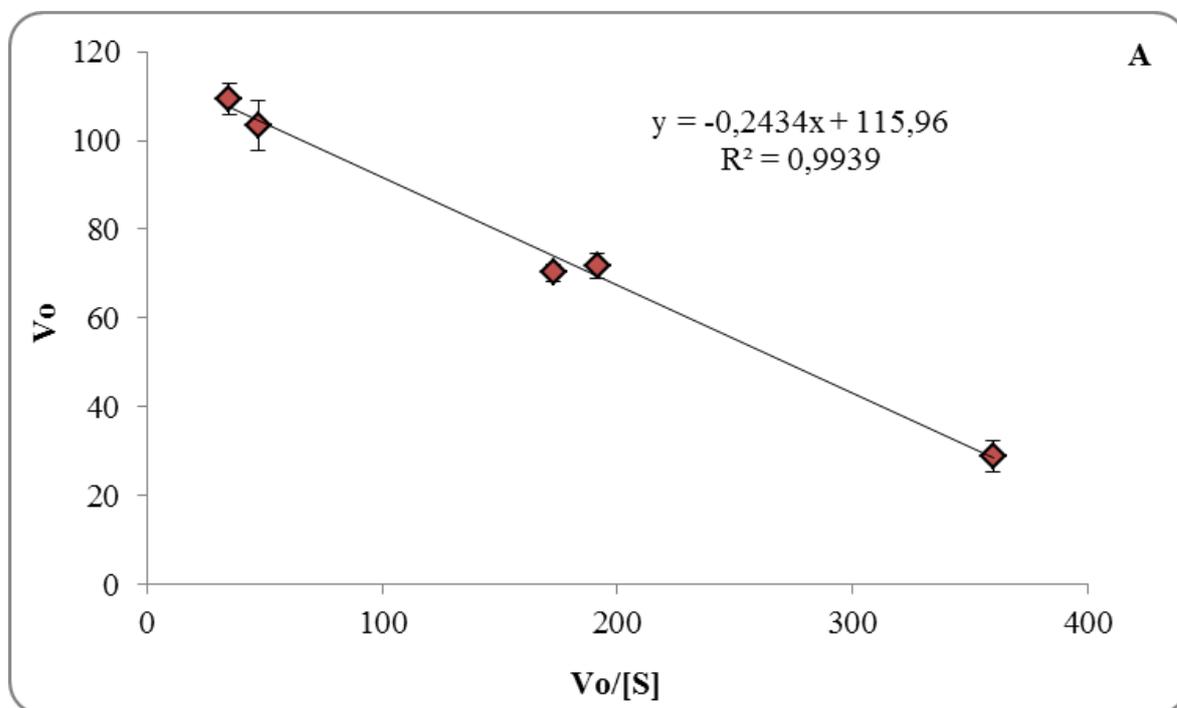
WIJAYANTI, H. B. et al. Identification of the binding of  $\beta$ -lactoglobulin ( $\beta$ -Lg) with sulfhydryl (-SH) blocking reagents by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and electrospray ionisation/time of flight-mass spectrometry (ESI/TOF-MS). **LWT-Food Science and Technology**, v. 63, n. 2, p. 934-938, 2015.

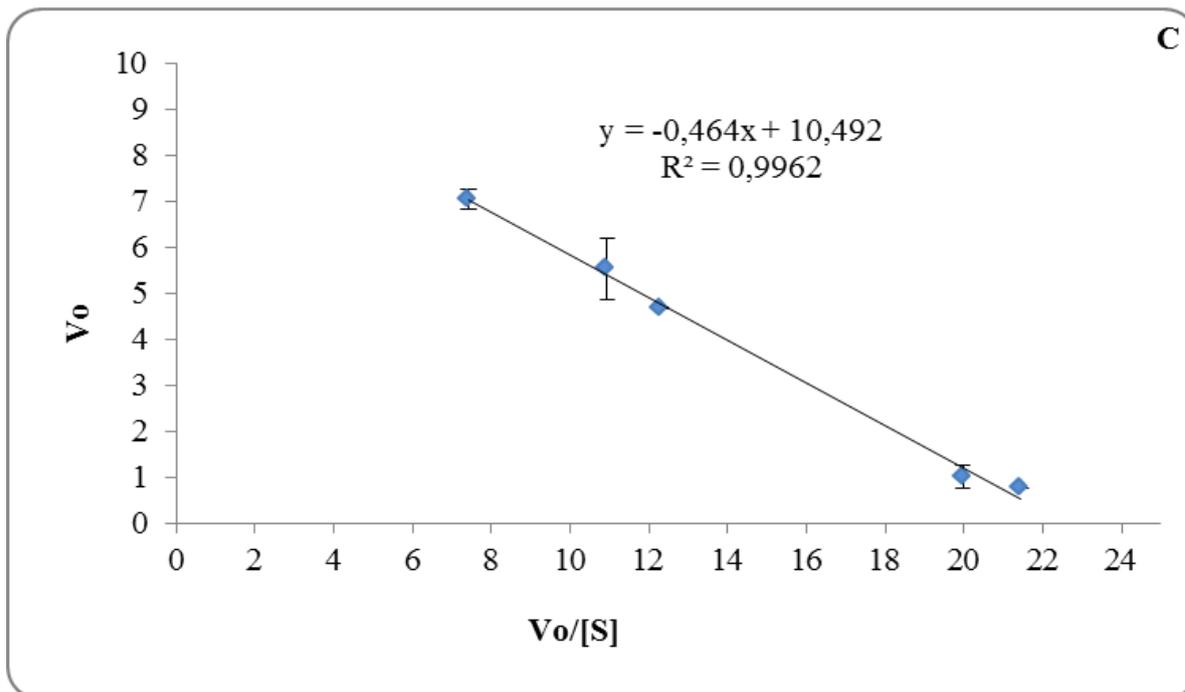
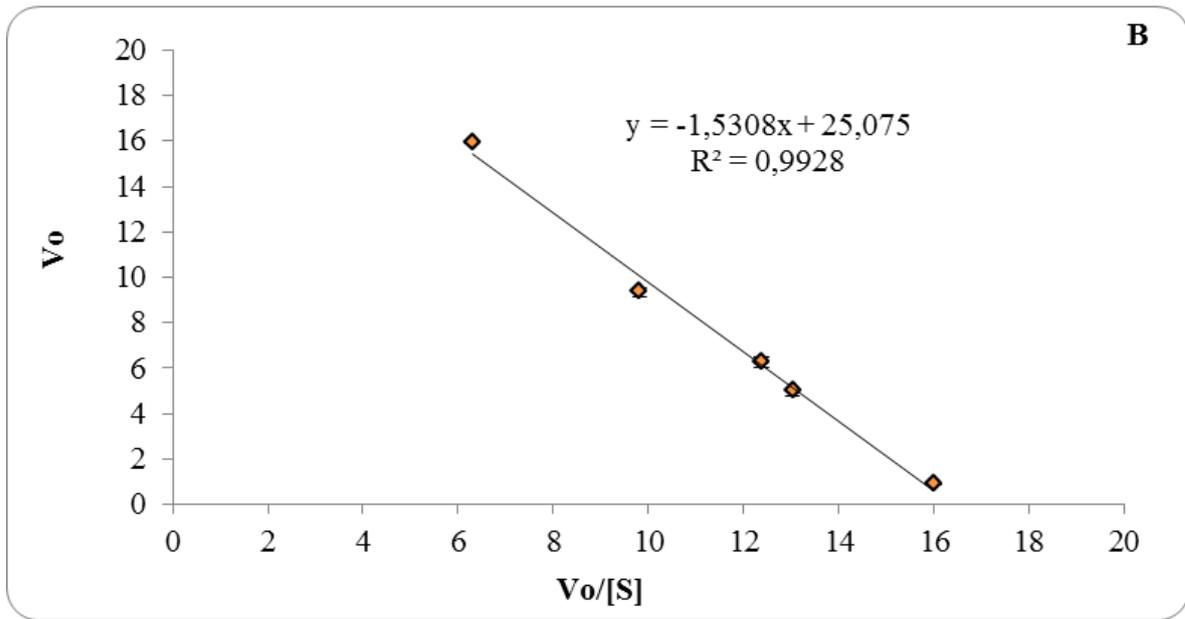
## APÊNDICES

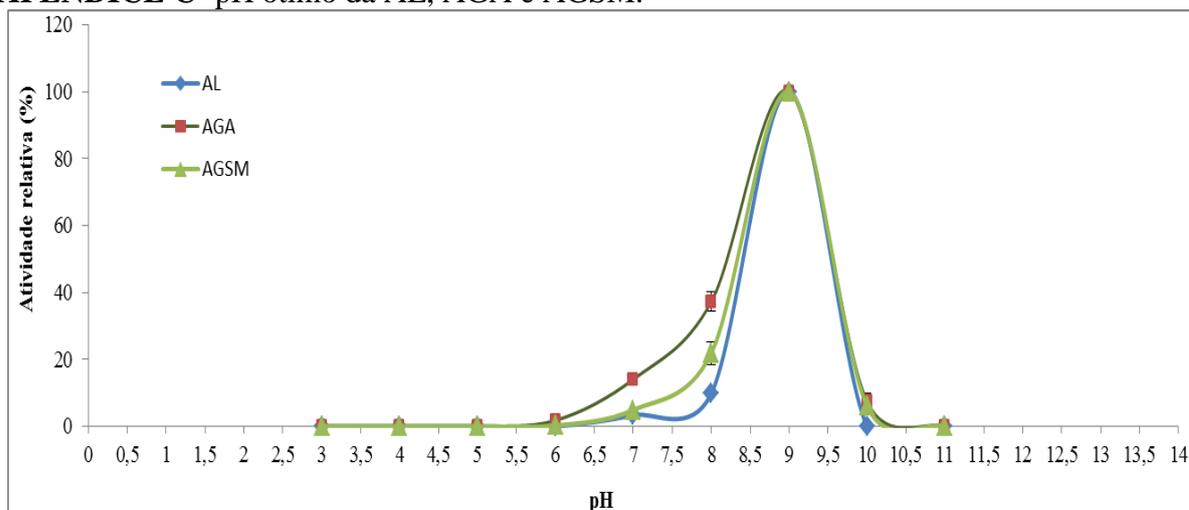
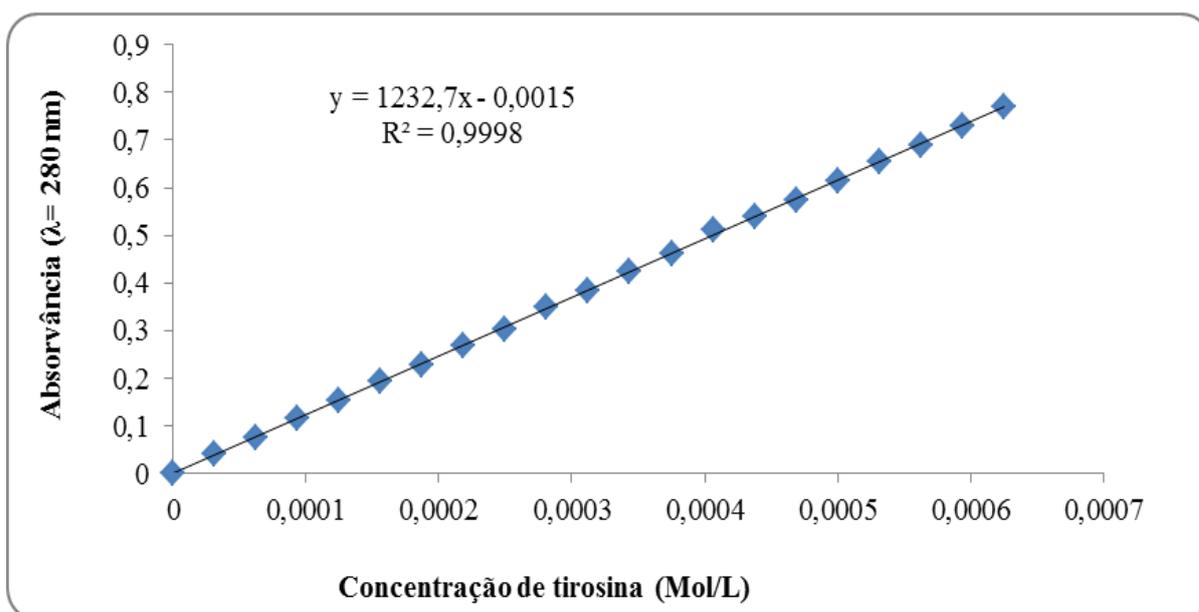
APÊNDICE A- Curva analítica do p-nitrofenol.

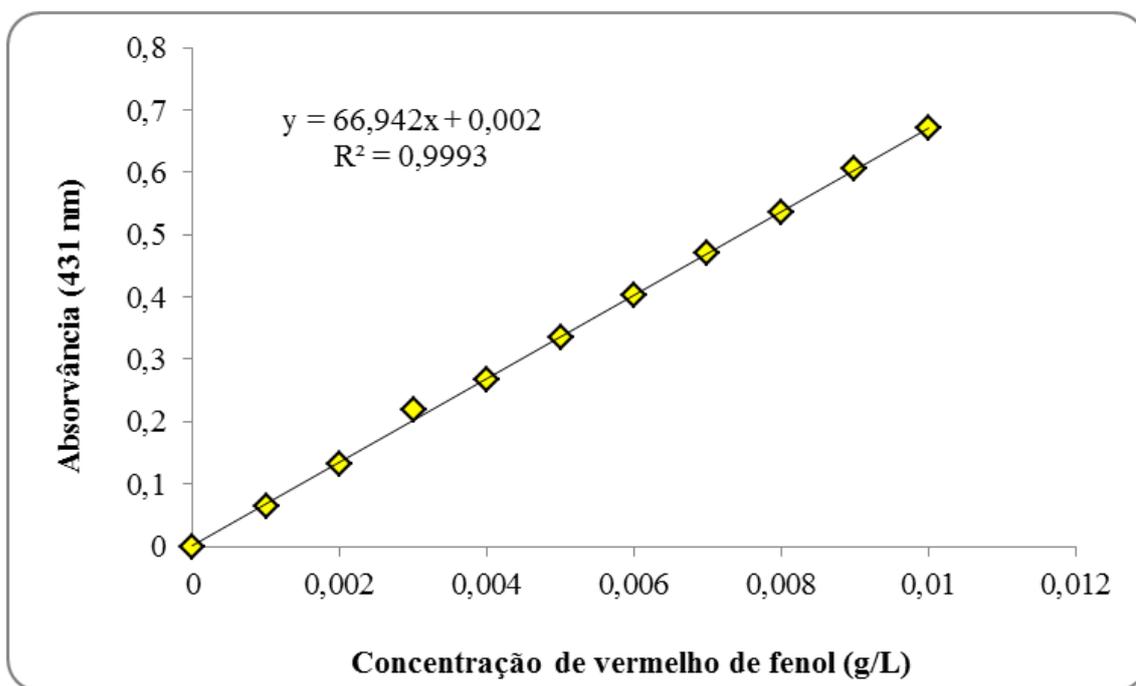
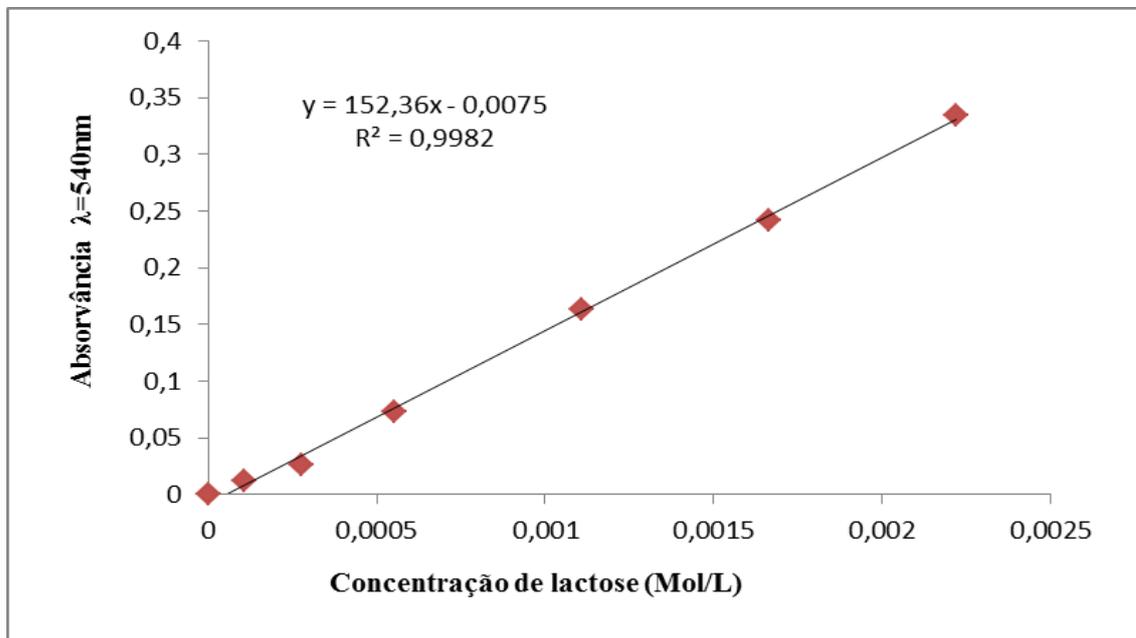


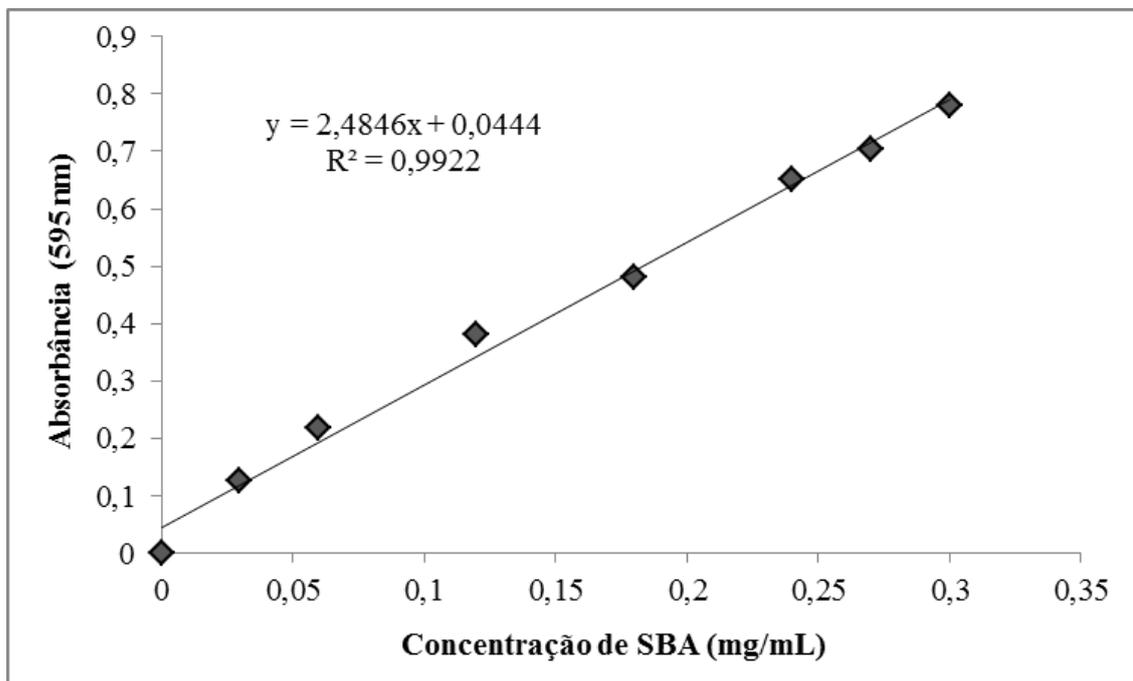
APÊNDICE B- Gráfico de Eadie-Hofstee de AL (A), AGA (B) e AGSM (C).





**APÊNDICE C-** pH ótimo da AL, AGA e AGSM.**APÊNDICE D-** Curva analítica da tirosina.

**APÊNDICE E-** Curva analítica do vermelho de fenol.**APÊNDICE F-** Curva analítica da lactose.

**APÊNDICE G-** Curva analítica da soroalbumina (SBA).**APÊNDICE H-** Curva analítica da leucina.