



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação Farmácia-Bioquímica



**HIDRÓLISE PARCIAL DA CASEÍNA E OVOALBUMINA UTILIZANDO A
PROTEASE VEGETAL FICINA: DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE
E QUELANTE DE FERRO**

Lívia Rangel Tsujimoto

Araraquara – SP
2022

Livia Rangel Tsujimoto

**HIDRÓLISE PARCIAL DA CASEÍNA E OVOALBUMINA UTILIZANDO A
PROTEASE VEGETAL FICINA: DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE E QUELANTE DE FERRO**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Farmácia-bioquímica da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
para obtenção do grau de Farmacêutica-
bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Rubens Monti

Coorientadora: Dra. Juliana Cristina
Bassan

Araraquara – SP

2022

T347h

Tsujimoto, Livia Rangel.

Hidrólise parcial da caseína e ovoalbumina utilizando a protease vegetal ficina: determinação de atividade antioxidante e quelante de ferro / Livia Rangel Tsujimoto. – Araraquara: [S.n.], 2022.
29 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação: Farmácia-Bioquímica)
– Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Rubens Monti.

Coorientadora: Juliana Cristina Bassan.

1. Ficina. 2. Hidrólise enzimática. 3. Atividade quelante. 4. Atividade antioxidante. I. Monti, Rubens, orient. II. Bassan, Juliana Cristina, coorient. III. Título.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, pelo amor, amizade, pelos grandes exemplos de pessoas e profissionais, apoio incondicional e por sempre serem o meu porto seguro. Agradeço por muitas vezes terem deixado de viver seus sonhos, para que eu pudesse viver os meus.

AGRADECIMENTOS

Um agradecimento especial aos meus orientadores, principalmente a Jú por toda paciência, boa vontade e prontidão comigo todas às vezes que precisei de ajuda ou de uma palavra de encorajamento; uma professora exemplar. Obrigada pela oportunidade de aprender com vocês.

Agradeço a família República Breja-Flor por todos os anos de companhia, parceria e amizade; tudo tornou-se mais leve e possível ao lado de vocês!

Ao meu namorado Lucas, por todos os momentos de paciência, companheirismo, amizade e palavras de força durante essa caminhada.

Agradeço aos meus colegas de laboratório de Enzimologia, pela ajuda em meus experimentos, pelo ambiente agradável, leve, pelas conversas encorajadoras e por todas as dicas valiosas. Em especial à Maisa por todo auxílio durante o desenvolvimento do projeto, didática e paciência indescritíveis.

A UNESP por todas as experiências que me proporcionou, por todos os amigos que levarei para sempre no meu coração e por todo aprendizado. Grata por todos os momentos de risada, amizade, festas e campeonatos. Pelos momentos de dificuldades, que me proporcionaram um amadurecimento não só profissional como pessoal e me ajudaram a tornar-me a pessoa que sou hoje.

Por fim, agradeço a Deus por ser sempre meu fiel companheiro em todos os momentos da minha vida, pela força durante essa jornada quando pensei em abandonar tudo e por sempre guiar meus caminhos.

RESUMO

Ficina (EC 3.4.22.3) é uma enzima proteolítica obtida do látex de figos da figueira *Ficus carica*. O objetivo do projeto foi hidrolisar matérias primas de baixo custo, no caso a caseína e a ovoalbumina, visando à obtenção de hidrolisados proteicos com propriedades bioativas que pudessem agregar valor nutricional e funcional. Antes de iniciar os ensaios de hidrólise, os parâmetros cinéticos da ficina (pH e temperatura de máxima atividade) foram determinados através da cinética contínua; apresentando picos de atividade a 55°C e pH 8,0. Os hidrolisados da caseína e ovoalbumina produzidos foram avaliados através da dosagem de proteínas, SDS-PAGE, atividade antioxidante pelo radical ABTS⁺ e atividade quelante de ferro. O perfil dos hidrolisados proteicos da caseína e ovoalbumina foram avaliados por SDS-PAGE em suas respectivas concentrações 3,96 mg/ml e 4,90 mg/ml. Os resultados apresentados nos géis de eletroforese de ambas as proteínas demonstram que somente com 1 hora de hidrólise, a grande maioria das proteínas de diferentes pesos moleculares foram eficientemente hidrolisadas pela enzima ficina. A análise dos hidrolisados proteicos de ovoalbumina obtidos, quanto a sua capacidade de quelar íons Fe²⁺, demonstrou que no tempo de 8 horas obteve-se a máxima atividade quelante (86,9%), apresentando um aumento de 16,9% na sua capacidade de quelar íons Fe⁺² quando comparado a proteína não hidrolisada. A caseína hidrolisada também, após 8 horas apresentou 5x maior capacidade de quelar íons de Fe⁺² do que a proteína original. Em relação a capacidade antioxidante, observou-se que tanto os hidrolisados proteicos da caseína quanto da ovoalbumina obtidos com a enzima ficina, possuem capacidade de reduzir o radical ABTS⁺. A caseína apresentou uma maior capacidade antioxidante se comparado a ovoalbumina em todos os tempos de hidrólise e se mostrou mais efetiva nos tempos 4 horas e 6 horas de hidrólise. Já os hidrolisados da ovoalbumina apresentaram-se mais eficientes após 2 horas de hidrólise. Portanto concluímos que a especificidade enzimática afetou diretamente as propriedades bioativas, pois tanto a caseína quanto a ovoalbumina apresentaram maior capacidade de quelar íons Fe⁺² e capacidade antioxidante quando comparado a sua forma não hidrolisada. Com os resultados analisados, concluiu-se que os hidrolisados proteicos demonstraram potencial antioxidante e quelante de metais; dessa forma a atividade antioxidante seria interessante em relação ao valor nutricional e conservante. Assim como atividade quelante de metais também seria uma alternativa para conservação de alimentos, visto que metais como o ferro são necessários para o crescimento de microrganismos patogênicos.

Palavras-chave: ficina; hidrólise enzimática; atividade quelante; atividade antioxidante.

ABSTRACT

Ficin (EC 3.4.22.3) is a proteolytic enzyme obtained from the latex of figs from the fig tree *Ficus carica*. The objective of the project was to hydrolyze low-cost raw materials, as casein and ovalbumin, in order to obtain protein hydrolysates with bioactive properties that could add nutritional and functional value. Before starting the hydrolysis tests, the kinetic parameters of ficin (pH and temperature of maximum activity) were determined through continuous kinetics, showing activity peaks at 55° C and pH 8.0. The casein and ovalbumin hydrolysates produced were evaluated through protein dosage, SDS-PAGE, antioxidant activity by the ABTS+ radical and iron chelating activity. The profile of casein and ovalbumin protein hydrolysates were evaluated by SDS-PAGE at their respective concentrations of 3.96 mg/ml and 4.90 mg/ml. The results presented in the electrophoresis gels of both proteins demonstrate that with only 1 hour of hydrolysis, the vast majority of proteins of different molecular weights were efficiently hydrolyzed by the enzyme ficin. The analysis of the protein hydrolysates of ovalbumin obtained, in terms of their capacity to chelate Fe²⁺ ions, showed that within 8 hours the maximum chelating activity was obtained (86.9%), with an increase of 16.9% in its capacity to chelate Fe²⁺ ions when compared to non-hydrolyzed protein. The hydrolyzed casein also, after 8 hours, showed 5 times greater capacity to chelate Fe²⁺ ions than the original protein. Regarding the antioxidant capacity, it was observed that both casein and ovalbumin protein hydrolysates obtained with the ficin enzyme have the ability to reduce the ABTS+ radical. Casein showed a higher antioxidant capacity compared to ovalbumin at all hydrolysis times and was more effective at 4 hours and 6 hours of hydrolysis. Ovalbumin hydrolysates were more efficient after 2 hours of hydrolysis. Therefore, it is possible to conclude that the enzymatic specificity directly affected the bioactive properties, as both casein and ovalbumin showed a greater ability to chelate Fe²⁺ ions and antioxidant capacity when compared to their non-hydrolyzed form. With the analyzed results, it was concluded that the protein hydrolysates showed antioxidant and metal chelating potential; thus, the antioxidant activity would be interesting in relation to the nutritional and preservative value. As well as metal chelating activity, it would also be an alternative for food preservation since metals such as iron are necessary for the growth of pathogenic microorganisms.

Keywords: ficin, enzymatic hydrolysis; chelating activity; antioxidant activity.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1**-pH de atividade máxima da enzima ficina. Fonte: Tsujimoto, 2022 19
- Figura 2**-Temperatura de atividade máxima da enzima ficina. Fonte: Tsujimoto, 2022 19
- Figura 3**- SDS-PAGE-12%: perfil proteico da Ovoalbumina antes e após hidrólise com a enzima ficina (A) padrão de massa molecular; (B) não hidrolisado; (C) 1 hora de hidrólise; (D) 2 horas de hidrólise, (E) 4 horas de hidrólise; (F) 6 horas de hidrólise; (G) 8 horas de hidrólise, (H) 24 horas de hidrólise. Fonte: Tsujimoto, 2022 20
- Figura 4**- SDS-PAGE-12%: perfil proteico da Caseína antes e após hidrólise com a enzima ficina (A) padrão de massa molecular; (B) não hidrolisado; (C) 1 hora de hidrólise; (D) 2 horas de hidrólise; (E) 4 horas de hidrólise; (F) 6 horas de hidrólise; (G) 8 horas de hidrólise, (H) 24 horas de hidrólise. Fonte: Tsujimoto, 2022 21
- Figura 5**- Curva Analítica para determinação de Equivalentes de Trolox (mM) utilizando o radical ABTS+. Fonte: Tsujimoto, 2022 21
- Figura 6**- Avaliação da atividade antioxidante em % de redução de ABTS●+ dos hidrolisados proteicos obtidos com diferentes tempos de hidrólise utilizando a ficina. Fonte: Tsujimoto, 2022 22
- Figura 7**- Atividade quelante de ferro dos hidrolisados da ovoalbumina obtidos com a enzima ficina no tempo de 24 h. Fonte: Tsujimoto, 2022 23
- Figura 8**- Atividade quelante de ferro dos hidrolisados da caseína obtidos com a enzima ficina no tempo de 24 h. Fonte: Tsujimoto, 2022 23

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1 Enzimas	9
1.2 Protease vegetal: Ficina	10
1.3 Proteína do leite: Caseína	11
1.4 Ovoalbumina	12
1.5 Hidrolisados proteicos e peptídeos bioativos	12
2. OBJETIVOS	14
2.1 Objetivos gerais	14
2.2 Objetivos específicos	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1 Materiais	14
3.2 Métodos	14
3.2.1. Determinação de proteínas totais	14
3.2.2 Análise do perfil proteico das proteínas caseína e ovoalbumina não hidrolisadas e hidrolisadas por SDS-PAGE	15
3.2.3 Determinação da atividade da enzima ficina	15
3.2.4 Determinação do pH e temperatura de máxima atividade	16
3.2.5. Obtenção dos hidrolisados das proteínas da caseína e ovoalbumina com a enzima ficina	17
3.2.6. Determinação da atividade antioxidante	17
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
4.1 Determinação de proteínas totais	18
4.2 Determinação do pH e temperatura de máxima atividade da enzima ficina	18
4.3 Análise do perfil proteico da caseína e ovoalbumina e dos seus hidrolisados por SDS-PAGE	20
4.4 Determinação da atividade antioxidante	21
4.5 Determinação da atividade quelante de metais	22
5. CONCLUSÃO	24
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25

1. INTRODUÇÃO

1.1 Enzimas

As enzimas são proteínas, ou seja, polímeros de cadeia longa constituídos por aminoácidos que se conectam consecutivamente uns aos outros através de ligações peptídicas em uma sequência específica e que apresentam atividade catalítica. (MARQUES MARIA, 2014). Podem ser obtidas de fontes vegetais, animais ou microbiana. Os processos catalisados por enzimas normalmente apresentam maior especificidade e são ambientalmente sustentáveis (MONTEIRO; SILVA, 2009). São catalisadores biológicos com propriedades notáveis, pois aumentam a velocidade de reações químicas nas condições do ambiente celular, apresentam especificidade por seus subprodutos, não produzem contaminantes e podem ter sua atividade catalítica regulada (VOET; VOET, 2013).

As proteases compõem um grupo de enzimas hidrolíticas que promovem a hidrólise de ligações peptídicas presentes em proteínas e peptídeos. Podem ser classificadas como endo e exopeptidases, onde a primeira atua em diversos sítios ao longo da cadeia proteica, liberando fragmentos moleculares maiores e a segunda opera na região amino ou carboxil terminal das proteínas. Cada vez mais as proteases como papaína, bromelina e tripsina têm encontrado aplicações em diversas áreas industriais como, indústria farmacêutica, de detergentes e na melhora de propriedades nutricionais de alimentos proteicos, por exemplo, alterando as matrizes proteicas e qualidade sensorial, entre outras (MAZORRA-MANZANO; RAMÍREZ-SUAREZ; YADA, 2018; MORELLON-STERLING et al., 2020).

As proteases vegetais têm despertado grande interesse, principalmente em aplicações alimentícias, em relação ao grupo de consumidores veganos e vegetarianos, pois este apresentou uma certa rejeição às proteases de origem animal devido uma associação aos riscos de transmissão de doenças e em alguns países, as proteases recombinantes não podem ser utilizadas em alimentos para consumo humano. Nesse sentido, a ficina é considerado um extrato enzimático composto por várias proteases que é obtido a partir do látex do figo (*Ficus carica*) (MORELLON-STERLING et al., 2020). Neste trabalho, foi utilizada a enzima proteolítica ficina, pertencente à classe das hidrolases que são enzimas que possuem a capacidade de clivar ligações covalentes entre os aminoácidos com adição de água (MONTEIRO;

SILVA, 2009). Dentre as subdivisões desse grupo de enzimas, a ficina pode ser classificada como cisteína endopeptidase (MARQUES, 2016).

O crescente interesse da academia pela ficina se deve às novas aplicações encontradas para o extrato proteolítico (por exemplo, produção de fragmentos de antibióticos ativos) e à maior atenção que algumas aplicações clássicas estão despertando, como coagulação do leite ou amaciamento da carne (MORELLON-STERLING et al., 2020). A produção de hidrolisados proteicos visando a obtenção de fragmentos como os peptídeos com atividade biológica, é uma das importantes aplicações de proteases vegetais como a ficina, papaína e bromelina, mas vale ressaltar a sua aplicabilidade na indústria de alimentos, como na fabricação de cervejas, maturação de queijos, amaciamento de carne e na produção de hidrolisados funcionais (SILVA, 2013).

Devido a todas essas possíveis aplicações, o estudo da capacidade hidrolítica da protease ficina, permitiu que explorássemos seu potencial para a produção de hidrolisados proteicos da caseína e ovoalbumina, que são fontes interessantes por apresentarem um baixo custo e serem muito disponíveis; além de apresentarem propriedades bioativas.

1.2 Protease vegetal: Ficina

A ficina é uma enzima proteolítica obtida do látex de figos da figueira *Ficus carica* L. Trata-se de uma planta, da classe das dicotiledôneas e da família *Moraceae*. A ficina em geral, tende a ser utilizada nos mesmos setores que a bromelina e a papaína (LEONEL; SAMPAIO, 2011).

O látex do figo imaturo (*Ficus carica* L), que é resultado da mistura de metabólitos secundários, tem a função fisiológica de proteger a planta contra patógenos em regiões que foram lesadas no tecido vegetal. Entre esses metabólitos, estão um conjunto de proteases cisteínicas (isoformas de endoproteases) denominado de ficina (MORELLON-STERLING et al., 2020); esta apresenta peso molecular médio de 25.000 Da. Suas condições ótimas de pH e temperatura estão entre: 5,0 e 8,0 e 50°C e 55°C respectivamente (MARQUES, 2016).

Dentre suas possíveis aplicações, a ficina está sendo empregada na produção de fragmentos de antibióticos ativos, mas com maior atenção para algumas aplicações clássicas, como coagulação do leite ou amaciamento da carne visto que promove o rompimento do colágeno no tecido conectivo e nas proteínas contráteis. Também foi

utilizada na hidrólise de anticorpos para a produção de fragmentos de ligação de antígenos (Fab), resultando em um aprimoramento nas aplicações de anticorpos (MORELLON-STERLING et al., 2020). Além disso, a ficina em sua forma solúvel pode ser utilizada na eliminação de biofilmes de *Staphylococcus aureus*, onde resultará na redução da concentração necessária do antibiótico para que o microrganismo seja eliminado (BAIDAMSHINA et al., 2017).

1.3 Proteína do leite: Caseína

O leite é a secreção ou fluido viscoso de cor branca produzida pelas glândulas mamárias das fêmeas pertencentes à classe dos mamíferos. É uma emulsão natural, que possui elevado valor nutritivo. É composto preponderantemente de água (87,3%), e sólidos totais, (12,7%), assim distribuídos: proteínas totais, 3,3 a 3,5%; gordura, 3,5 a 3,8%; lactose, 4,9%; além de minerais, 0,7%, e vitaminas (SGARBIERI, 2004).

Em 2018 aproximadamente 843 milhões de toneladas de leite foram produzidos no mundo. A América do Sul, obteve a quarta colocação na participação da produção mundial, colaborando com 8% de toda a produção mundial que representou 62 bilhões de litros de leite em 2017, dos quais o Brasil foi responsável por mais de 50%, gerando em torno de 35 bilhões de litros (CORDEIRO DA SILVA, 2019).

No que diz respeito às proteínas do leite, 80% são representadas pela caseína, os outros 20% são proteínas do soro (BRASIL et al., 2015). As caseínas podem ser representadas por quatro proteínas principais: α s1-, α s2-, β - e κ -caseína, as quais possuem alta estabilidade térmica. As proteínas do leite são capazes de fornecer micronutrientes essenciais (cálcio e fósforo), componentes do sistema imune (imunoglobulinas e lactoferrina) e aminoácidos para o recém-nascido (LIVNEY, 2010).

Devido a sua importância comercial, procura-se compreender a estabilidade das proteínas do leite, pois é um fator primordial para garantir condições adequadas de processamento. O que resultaria em um prazo de validade maior dos derivados lácteos e assim proporcionando ao consumidor final uma melhor qualidade, uma vez que a elevada estabilidade térmica das caseínas viabiliza a fabricação de derivados lácteos submetidos aos processamentos de alta temperatura (BRASIL et al., 2015).

Estudos apontam que hidrolisados da caseína apresentam um alto potencial para serem ingredientes em alimentos funcionais. O complexo total das proteínas do leite, também têm gerado interesses comerciais, visto que proporcionam efeitos fisiologicamente benéficos como: melhora do desempenho físico, recuperação após

exercícios, prevenção de lesões musculares, saúde cardiovascular e gerenciamento de infecções microbianas e inflamação da mucosa (RAHMAN; KHAN; HASAN, 1994).

1.4 Ovoalbumina

Os ovos contêm uma variedade de substâncias com potencial nutricional, apresentando efeitos terapêuticos e fornecendo as necessidades nutricionais básicas, dessa forma é uma matéria-prima que vem sendo utilizada, tanto para fins alimentícios quanto para aplicações médicas (POSSAS, 2012). Também foi comprovado que o conteúdo dos ovos pode ser manipulado, através de vários métodos, para atingir certas funcionalidades destinadas à dieta ou produção de imunobiológicos vacinais (LUIZ; POSSAS, 2012).

Várias proteínas da clara do ovo e seus peptídeos demonstraram atividade imunomoduladora (LUIZ; POSSAS, 2012). A ovoalbumina, presente no ovo, corresponde a 54% da proteína da clara (STALDEMAN; COTTERILL, 1995). Fonte de inúmeros compostos biologicamente ativos da ovoalbumina apresentaram benefícios específicos para a saúde humana e animal, assegurando o seu papel no tratamento e prevenção das doenças crônicas e doenças infecciosas (LUIZ; POSSAS, 2012). Os peptídeos imunogênicos de ovoalbumina têm sido usados para aumentar a resposta imunológica em imunoterapia do câncer (VIDOVIC et al., 2002).

1.5 Hidrolisados proteicos e peptídeos bioativos

É correto afirmar que as proteínas para serem absorvidas precisam ser hidrolisadas, por isso a hidrólise enzimática vem sendo pauta de assuntos entre cientistas e profissionais da saúde. O tratamento enzimático tem como objetivo aprimorar as propriedades físico-químicas e funcionais dos alimentos, não prejudicando seu valor nutritivo e visando principalmente a melhoria da capacidade de absorção de proteínas (PACHECO et al., 2005).

Os peptídeos bioativos são fragmentos específicos obtidos através da hidrólise de proteínas, que proporcionam um impacto positivo sobre diversas funções corporais; ajudando na manutenção da boa saúde (MEISEL; FITZGERALD, 2003). Eles possuem alta afinidade em relação aos tecidos-alvo, o que resulta em baixa ou nenhuma toxicidade e alta efetividade em doses baixas e são facilmente degradados uma vez no meio ambiente. Enfatizando seu potencial biológico que impacta positivamente os principais sistemas do corpo humano: digestivo, cardiovascular,

imunológico e nervoso (ZHANG et al., 2010). Estudos também revelaram uma gama de aplicações de peptídeos bioativos relacionados com atividade antioxidante que podem ser utilizadas como aditivos alimentares, nutrientes da dieta e fármacos como uma opção aos antioxidantes sintéticos já usados, como o hidroxianisol de butila e o hidroxitolueno de butila que têm sido restringidos em suas aplicações alimentares devido a apresentarem potenciais riscos à saúde. Isso justifica o fato de nos últimos anos surgir um interesse maior em descobrir antioxidantes seguros e naturais (FONSECA RENATA, 2014).

Algumas sequências proteicas quando processadas por proteases podem produzir peptídeos que apresentam funções biológicas específicas diferentes da proteína original. Os peptídeos bioativos que são obtidos a partir de proteínas de grau alimentício, podem prevenir doenças e problemas cardiovasculares, digestivos, endócrinos e relacionados ao sistema imunológico, potencialmente prevenindo o desenvolvimento de hipertensão, diabetes, obesidade e câncer (CHAKRABARTI; GUHA; MAJUMDER, 2018; MAZORRA-MANZANO; RAMÍREZ-SUAREZ; YADA, 2018).

Algumas doenças ou condições clínicas, demandam a utilização de fórmulas especiais contendo hidrolisados proteicos como: doença de Crohn, colite ulcerativa, síndrome de intestino curto, fístulas, pancreatite, traumas severos, síndromes de imunodeficiência e determinadas alergias alimentares. Para a preparação destes alimentos é recomendável a utilização de hidrolisados compostos de 2 a 6 aminoácidos (massa molecular abaixo de 2kDa), pois isso facilita a sua absorção intestinal, evitando o surgimento de peptídeos amargos e a possibilidade de causarem efeitos alergênicos (PACHECO et al., 2005).

Além disso, hidrolisados derivados da caseína podem apresentar inúmeras funções que podem ser utilizadas como ingredientes que focam na melhoria e aplicabilidade de alimentos na indústria, podendo resultar em seu valor nutricional ou biológico aumentado; prevenindo reações oxidativas em alimentos processados, dessa forma podendo aumentar sua vida de prateleira (DE GOBBA et al., 2014). Podendo ser incorporados em alimentos funcionais, nutracêuticos e medicamentos; onde sua bioatividade pode atuar no controle e prevenção de doenças (ZHANG et al., 2010).

Cientistas de alimentos, profissionais da saúde e consumidores têm cada vez mais seu interesse despertado pelas propriedades benéficas à saúde e capacidade

de suprir funções nutricionais básicas dos alimentos funcionais e compostos bioativos. Estes são responsáveis por reduzir a epidemia mundial de doenças crônicas que correspondem a 58 milhões de mortes prematuras por ano. (PARK; NAM, 2015). Além disso, proteínas com propriedades funcionais e peptídeos bioativos, representam um setor importante dentro da categoria de nutracêuticos, onde o volume de vendas é avaliado em torno de US\$ 75 bilhões/ano; um mercado dinâmico em constante crescimento (CONTRERAS et al., 2011).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Hidrolisar as proteínas ovoalbumina e caseína com a enzima ficina.

2.2 Objetivos específicos

- a) Elaborar uma curva analítica para a dosagem de proteína;
- b) Hidrolisar as proteínas da ovoalbumina e caseína com a protease vegetal ficina;
- c) Determinar o perfil proteico das proteínas não hidrolisadas e hidrolisadas com ficina por SDS-PAGE
- d) Determinar o pH e temperatura de atividade máxima da enzima ficina
- e) Determinar atividade antioxidante nos diferentes hidrolisados;
- f) Determinar atividade quelante de metais nos diferentes hidrolisados.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

Para a caracterização das propriedades físico-químicas da enzima e utilização na hidrólise da caseína e ovoalbumina, foi utilizado como fonte da enzima ficina o látex obtido da colheita de frutos imaturos de *Ficus carica L.* gentilmente fornecido pelo Prof. Dr. Rubens Monti, Professor da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-UNESP. As proteínas caseína e ovoalbumina foram adquiridas da Sigma-Aldrich®. Todos os demais reagentes utilizados eram de grau analítico.

3.2 Métodos

3.2.1. Determinação de proteínas totais

Foi construída uma curva analítica para a determinação da concentração de proteínas totais a partir do método de Lowry et al. (1951), modificado por Hartree

(1972); seguindo os princípios da lei de Lambert-Beer. A BSA (Albumina do Soro Bovino) foi utilizada como padrão para quantificação proteica ($y=1,6772x + 0,0712$).

O método baseia-se na redução do Reagente de Folin-Ciocalteu, uma mistura contendo molibdato, tungstato e ácido fosfórico. Um composto de coloração azul é produzido quando o reagente sofre redução por reagir com as proteínas na presença do catalisador cobre (II).

3.2.2 Análise do perfil proteico das proteínas caseína e ovoalbumina não hidrolisadas e hidrolisadas por SDS-PAGE

A análise do perfil proteico da caseína e ovoalbumina e dos hidrolisados, foi realizada em condição desnaturante em gel poliacrilamida-SDS-PAGE (12%), com base no método Laemmli (1970); onde as proteínas são separadas por carga e massa molecular.

O kit GE Lifesciences® foi utilizado como padrão de massa molecular, composto por fosforilase B (97 kDa), BSA (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (31 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactoalbumina (14,4 kDa). A coloração dos géis foi realizada com Azul de Coomassie 250R.

As amostras foram previamente fervidas por 5 minutos em tampão contendo lauril sulfato de sódio (SLS) e β -mercaptoetanol (diluídas em 1:1), sendo este um potente antioxidante responsável por destruir as pontes de dissulfeto das proteínas que as configuram em seu estado terciário; dessa forma são capazes de adquirir seu estado primário e secundário facilitando sua corrida no gel. O detergente lauril sulfato de sódio (SDS) carrega as proteínas negativamente e pela diferença de potencial isso faz com que elas corram no gel do polo negativo ao positivo. O gel de poliacrilamida quando polimerizado forma uma “rede” que faz com que as proteínas migrem conforme sua massa molecular (SANTOS, 2017).

3.2.3 Determinação da atividade da enzima ficina

A atividade enzimática da ficina foi determinada através de um ensaio colorimétrico contínuo, utilizando o substrato Boc-Ala-ONp (éster-paranitrofenílico de N-butiloxicarbonil-L-alanina) (TARDIOLI et al., 2003). Para a realização do ensaio foram adicionados em uma cubeta 10 μ L da enzima ficina, 1.970 μ L de solução tampão fosfato de sódio (50 mmol. L⁻¹ pH 7,5) e 20 μ L de boc-Ala-ONp dissolvido em acetonitrila (31,03 mg/mL). A leitura foi efetuada em espectrofotômetro em $\lambda= 405$ nm em intervalos de 1 em 1 min por até 5 min.

Uma curva analítica foi construída para determinação do coeficiente de extinção molar do *p*-nitrofenol, produto de reação da hidrólise do substrato Boc-Ala-ONp. O coeficiente de absorvidade molar (ϵ) do *p*-nitrofenol foi de $9443 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, onde uma unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que hidrolisa $1 \mu\text{mol}$ de boc-Ala-ONp por minuto nas condições de ensaio.

3.2.4 Determinação do pH e temperatura de máxima atividade

Os valores de pH e temperatura de máxima atividade da enzima ficina foram determinados através da utilização do substrato sintético éster-paranitrofenílico de Nbutiloxicarbonil-L-alanina (Boc-Ala-ONp) seguindo metodologia descrita por TARDIOLI et al., 2003.

O método colorimétrico é determinado através da efetividade de hidrólise do substrato Boc-ALA-ONp que libera *p*-nitrofenol, foi utilizado para determinar o pH de máxima atividade da ficina. Sua atividade nos diferentes pH foi determinada pela equação 1:

$$\frac{U}{\text{mL}} = \frac{\Sigma \text{abs} \cdot 1000 \cdot \text{vt}}{\epsilon \cdot \Sigma t \cdot 1 \cdot \text{ve}} \quad (1)$$

Onde:

Σabs : é a somatória dos valores de absorbância durante a cinética contínua;

vt : volume total do ensaio em mL;

ϵ : coeficiente de extinção molar do *p*-nitrofenol;

Σt : somatório do tempo em minutos;

ve : volume total da enzima em mL.

Para determinar o pH de máxima atividade, foram realizados ensaios enzimáticos em um intervalo de valores de pH de 5,0 a 10,0 utilizando $2070 \mu\text{L}$ de tampão *standard* de McIlvaine (MCILVAINE, 1921) $20 \mu\text{L}$ do Boc-Ala-ONp (100 mM) e $10 \mu\text{L}$ da enzima ficina em 55°C em banho maria. Os ensaios foram realizados durante 2 min em agitação suave no agitador orbital e a absorbância medida no espectrofotômetro em 405 nm de 30 em 30 s.

Já a determinação de temperatura de máxima atividade foi realizada no intervalo de 30°C a 60°C , sob as mesmas condições da determinação de pH, porém utilizando o pH de máxima atividade determinada anteriormente. O período de

realização dos ensaios foi de 5 min em suave agitação no agitador orbital e a absorbância medida com o espectrofotômetro em 405 nm a cada minuto.

3.2.5. Obtenção dos hidrolisados das proteínas da caseína e ovoalbumina com a enzima ficina

Os hidrolisados das proteínas da ovoalbumina e caseína foram obtidos incubando-as com a ficina em pH ótimo 8 e temperatura ótima de 55°C.

Utilizou-se 5 ml da enzima ficina diluída 100x ($U = 0,063 \mu\text{mol min/mL}$ de enzima) para cada 25mL de solução proteica: caseína a 0,6% (m/v) em tampão fosfato 0,05M em pH 8 e ovoalbumina a 0,6% (m/v) em tampão fosfato 0,05M em pH 8. Os meios de reação foram mantidos em banho-maria sob agitação a 55° C e foram retiradas alíquotas nos tempos 0h, 1h, 2h, 4h, 6h, 8h e 24h que foram levados à fervura por 2 minutos para inativação da ficina.

3.2.6. Determinação da atividade antioxidante

A determinação da atividade antioxidante foi realizada através do método ABTS, cujo princípio é o da captura do cátion radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ (ácido [2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)]) por antioxidantes, produzindo descoloração da cor verde-escura para verde-clara proporcional à concentração de espécies antioxidantes, acompanhada do decréscimo da absorbância (PÉREZ-JIMÉNEZ; SAURA-CALIXTO, 2006). Com a perda de cor, a porcentagem de inibição do $\text{ABTS}^{\bullet+}$ é determinada em função do Trolox, antioxidante padrão submetido às mesmas condições de análise das amostras (MIWA, 2003).

3.2.7. Determinação da atividade quelante de metais

A atividade quelante de ferro foi realizada segundo a metodologia descrita por Kim et al. (2007) com adaptações. Foram utilizadas 200 μL dos hidrolisados obtidos para cada substrato proteico, 800 μL de água ultrapura e 20 μL de FeCl_2 (2mM em água). A reação iniciou-se com a adição de 40 μL de ferrozina (5 mM em água). Em seguida, agitou-se a mistura e deixamos em temperatura ambiente, protegida da luz por 10 min. A leitura da absorbância foi medida em espectrofotômetro em $\lambda = 562 \text{ nm}$. A atividade quelante do íon ferro foi calculada segundo a equação 2:

$$QF (\%) = \left[\frac{A_0 - A_1}{A_0} \right] \times 100 \quad (2)$$

Sendo: A_0 a absorbância do controle e A_1 absorbância da amostra. O controle foi feito com água ultrapura e o branco com solução de EDTA 2%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinação de proteínas totais

Foi realizada uma curva analítica padrão utilizando o método de Lowry et al. (1951), modificado por Hartree (1972). A equação da reta abaixo foi obtida a partir da curva analítica de soroalbumina bovina:

$$y = 1,6772x + 0,0712$$

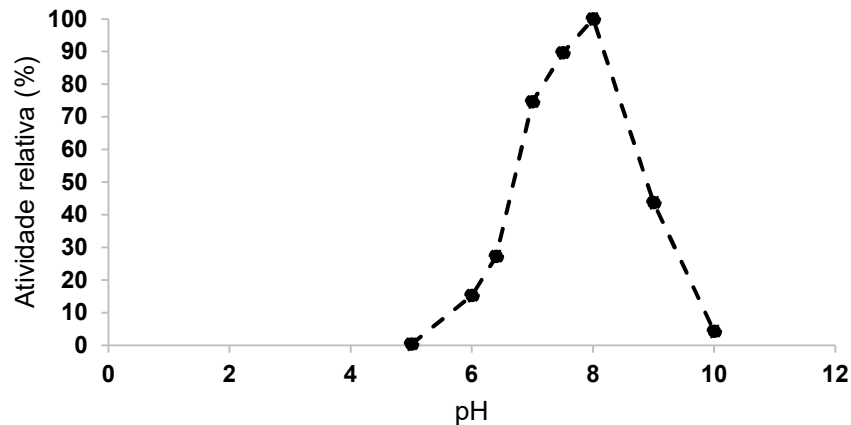
Através da equação de reta construída, obteve-se um coeficiente de absorvidade (ϵ) de $1,6772 \text{ (mg/mL)}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, utilizado para a determinação de proteínas totais da solução de caseína, que apresentou um resultado de 3,96 mg/mL e na solução de ovoalbumina, onde o valor encontrado foi de 4,90 mg/mL.

4.2 Determinação do pH e temperatura de máxima atividade da enzima ficina

O pH de máxima atividade de uma reação enzimática é o momento em que a catálise é favorecida chegando a sua máxima eficiência, ou seja, quando o valor de atividade enzimática é máximo. As propriedades físico-químicas podem impactar diretamente a cinética enzimática, por exemplo, o pH da reação tem a capacidade de alterar as cargas dos aminoácidos que compõem as enzimas. Podendo causar alterações na estrutura conformacional destas moléculas implicando em perda ou incremento de atividade (ADRIANO, 2008)

Observando a figura 1, nota-se que a ficina apresenta boa atividade catalítica entre os pH 7,0 e 8,0 com atividade relativa maior que 90% nas condições de ensaio, sendo o pH 8,0 a condição de máxima atividade. Aproximando-se do relato na literatura de pH ótimo que se encontra na faixa de 5,0 e 7,5 (MARQUES, 2016).

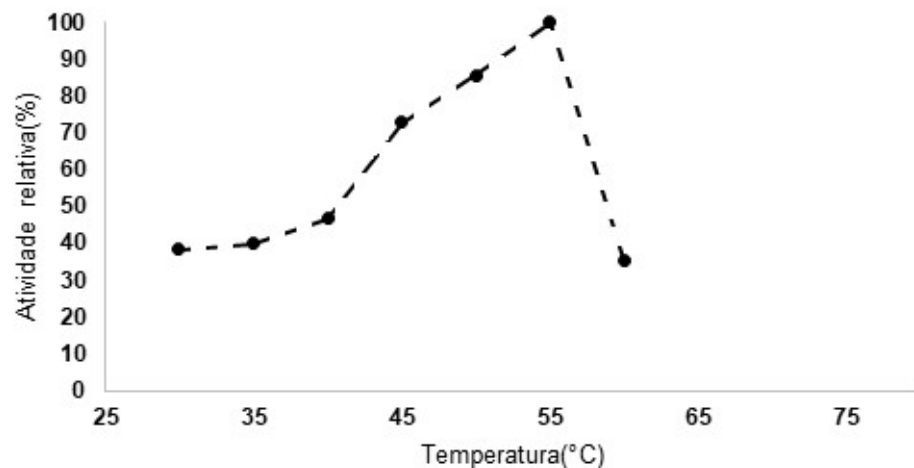
Figura 1-pH de atividade máxima da enzima ficina. Fonte: Tsujimoto, 2022



A temperatura também tem um impacto significativo na cinética enzimática, visto que pode prejudicar ou acelerar a velocidade da reação. Os resultados da determinação da temperatura ótima, àquela em que a reação é mais favorecida são apresentados na Figura 2. Estes experimentos foram realizados em cinética contínua durante 5 minutos já com o pH 8,0 de máxima atividade que foi previamente definido. Por fim, a medida da absorbância das diferentes temperaturas foi determinada e a temperatura de máxima atividade foi definida através da Equação 1.

A protease vegetal ficina apresentou temperatura de máxima atividade a 55 °C e atividade relativamente alta nas temperaturas entre 45°C–55°C corroborando com os valores descritos na literatura em que esta enzima possui atividade ótima na faixa de 50°C e 55°C (MARQUES, 2016).

Figura 2-Temperatura de atividade máxima da enzima ficina. Fonte: Tsujimoto, 2022

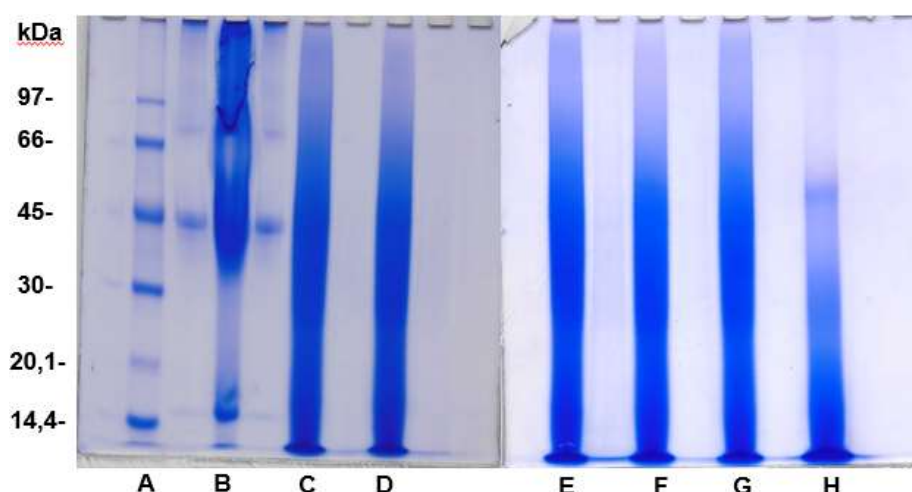


4.3 Análise do perfil proteico da caseína e ovoalbumina e dos seus hidrolisados por SDS-PAGE

O perfil dos hidrolisados proteicos da caseína e ovoalbumina foram avaliados por SDS-PAGE (Figuras 3 e 4).

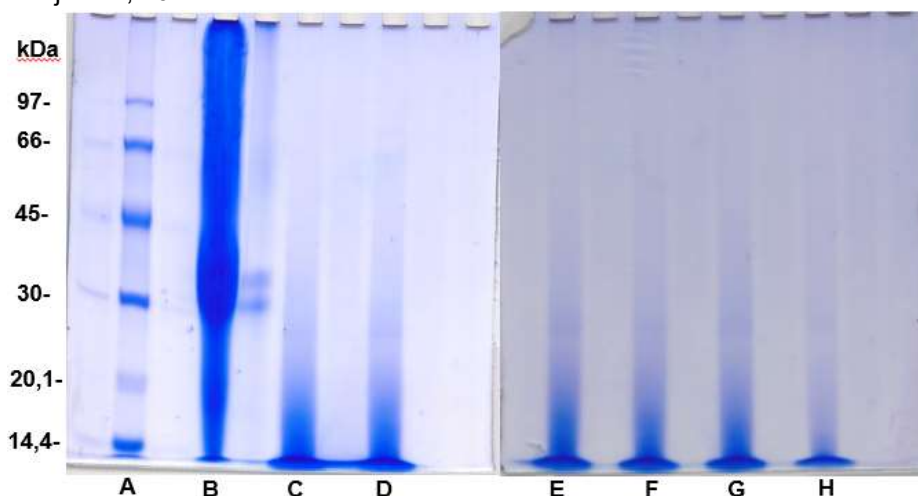
Os resultados apresentados no gel de eletroforese da ovoalbumina demonstram que foi possível observar (Figura 3) que já na primeira hora de hidrólise, proteínas com diferentes massas moleculares foram eficientemente hidrolisadas pela enzima ficina. Comparando a raia (B) não hidrolisada com a (H) após 24 horas de hidrólise, percebe-se que houve hidrólise de proteínas.

Figura 3- SDS-PAGE-12%: perfil proteico da Ovoalbumina antes e após hidrólise com a enzima ficina (A) padrão de massa molecular; (B) não hidrolisado; (C) 1 hora de hidrólise; (D) 2 horas de hidrólise, (E) 4 horas de hidrólise; (F) 6 horas de hidrólise; (G) 8 horas de hidrólise, (H) 24 horas de hidrólise. Fonte: Tsujimoto, 2022



Em relação aos resultados apresentados no gel de eletroforese da caseína (Figura 4), observa-se que somente com 1 h de hidrólise, a grande maioria das proteínas de diferentes pesos moleculares foram eficientemente hidrolisadas pela enzima ficina. A raia (C) 1 h de hidrólise comparada a (H) após 24 horas de hidrólise não apresentam diferenças visuais relevantes, portanto sendo 1 hora tempo suficiente para obter uma boa hidrólise das proteínas.

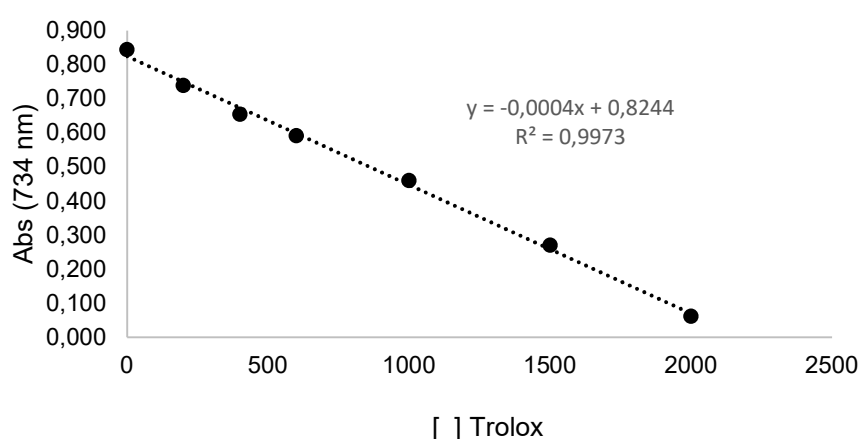
Figura 4- SDS-PAGE-12%: perfil proteico da Caseína antes e após hidrólise com a enzima ficina (A) padrão de massa molecular; (B) não hidrolisado; (C) 1 hora de hidrólise; (D) 2 horas de hidrólise; (E) 4 horas de hidrólise; (F) 6 horas de hidrólise; (G) 8 horas de hidrólise, (H) 24 horas de hidrólise. Fonte: Tsujimoto, 2022



4.4 Determinação da atividade antioxidante

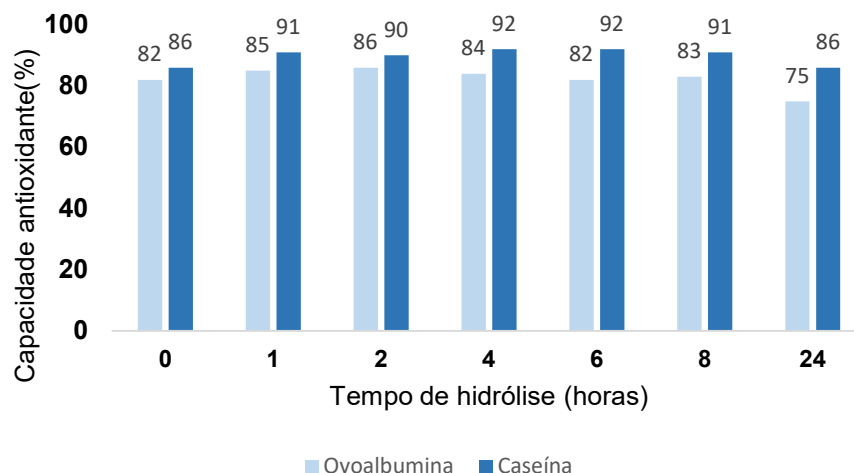
Inicialmente uma curva analítica (Figura 5) foi construída para obtenção da equação da reta, sendo o Trolox o padrão antioxidante. Dessa maneira foi possível quantificar a equivalência ao Trolox dos hidrolisados proteicos obtidos pela ação enzima ficina.

Figura 5- Curva Analítica para determinação de Equivalentes de Trolox (mM) utilizando o radical ABTS+. Fonte: Tsujimoto, 2022



A determinação da atividade antioxidante foi realizada através dos hidrolisados proteicos obtidos, estes foram avaliados quanto a sua capacidade de reduzir o radical livre ABTS^{•+}, e os resultados foram comparados em função de um potente antioxidante padrão; o Trolox. Os resultados encontrados podem ser observados na Figura 6:

Figura 6- Avaliação da atividade antioxidante em % de redução de ABTS●+ dos hidrolisados proteicos obtidos com diferentes tempos de hidrólise utilizando a ficina. Fonte: Tsujimoto, 2022



Através da figura 6, percebemos que em todos os tempos os hidrolisados proteicos da caseína quanto da ovoalbumina obtidos com a enzima ficina, possuem capacidade antioxidante. A caseína apresentou uma maior capacidade antioxidante se comparado a ovoalbumina em todas os períodos e se mostra mais efetiva nos tempos 4 e 6 horas de hidrólise. Já os hidrolisados da ovoalbumina apresentam-se mais eficientes no tempo de 2 horas de hidrólise.

4.5 Determinação da atividade quelante de metais

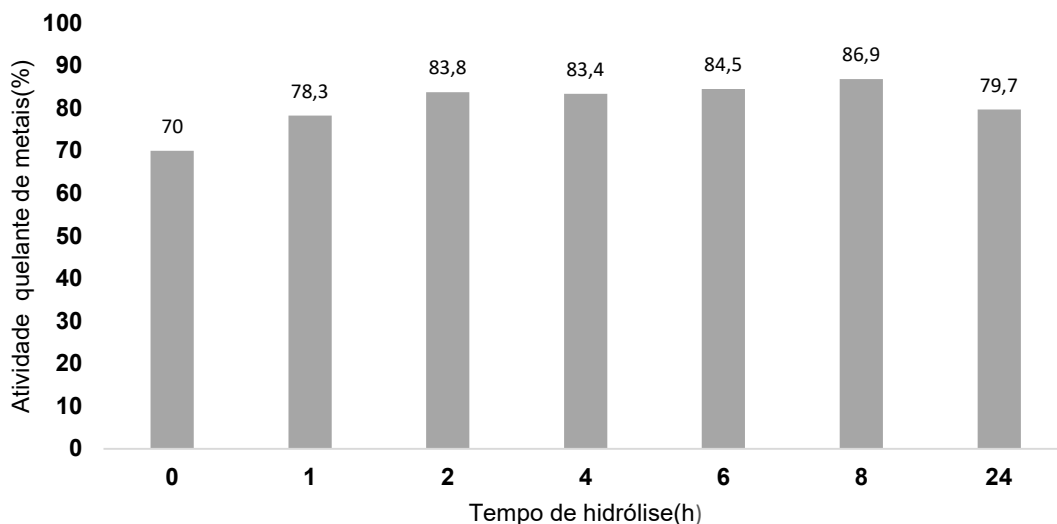
A atividade quelante de íons ferro está associada à atividade antioxidante devido a importância desses metais na catálise de espécies reativas de oxigênio, sendo de grande importância na anulação dos radicais de hidroxila e o superóxido, que podem ocasionar peroxidação lipídica e danos ao DNA (ZHANG et al., 2010).

A determinação da atividade quelante de metais dos hidrolisados obtidos da caseína e ovoalbumina através da enzima ficina, foram analisados quanto a sua capacidade de quelar íons Fe^{+2} .

O experimento se baseia na medida indireta da capacidade quelante de ferro dos hidrolisados proteicos. Na presença do íon ferro (II), a ferrozina que é um agente quelante, forma complexos de coloração rosácea e a absorbância desses pode ser medida por espectrofotometria. Portanto, para medir a capacidade quelante dos hidrolisados proteicos, estes são dispostos na presença de ferro (II) e posteriormente adiciona-se a ferrozina. As moléculas de ferro que não foram queladas pelos hidrolisados ficam livres para formarem o complexo ferrozina-ferro (II) (RIBEIRO, 2017).

Observou-se que no tempo de 8h (Figura 7) obteve-se a máxima atividade quelante (86,9%), assim a ovoalbumina quando hidrolisada apresenta um aumento de 16,9% na sua capacidade de quelar íons Fe^{+2} .

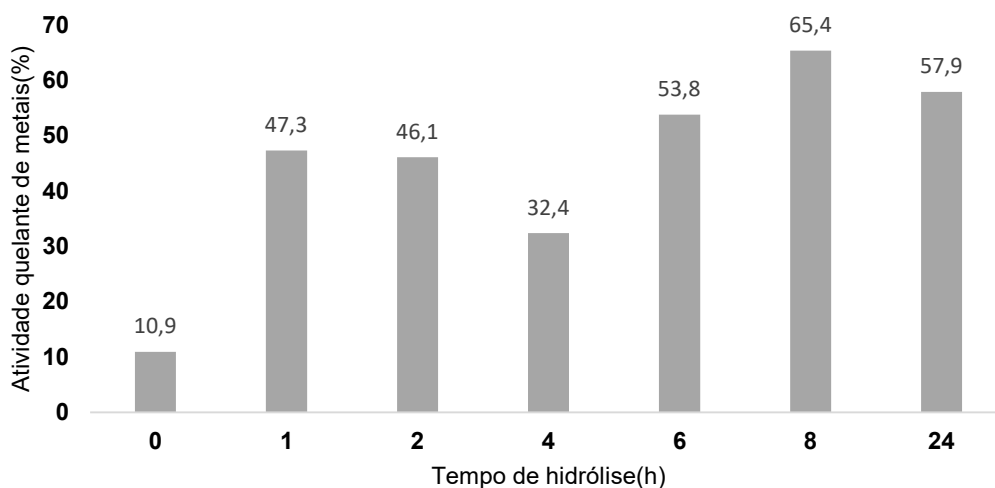
Figura 7- Atividade quelante de ferro dos hidrolisados da ovoalbumina obtidos com a enzima ficina no tempo de 24 h. Fonte: Tsujimoto, 2022



A atividade máxima quelante de metais da caseína hidrolisada (Figura 8) também se dá no tempo de 8h, onde esta apresenta 54,5% mais capacidade de quelar íons de Fe^{+2} em relação a não hidrolisada.

Portanto é possível concluir que a especificidade enzimática afetou diretamente as propriedades bioativas, pois tanto a caseína quanto a ovoalbumina apresentam maior capacidade de quelar íons Fe^{+2} quando comparado a seu estado não hidrolisado.

Figura 8- Atividade quelante de ferro dos hidrolisados da caseína obtidos com a enzima ficina no tempo de 24 h. Fonte: Tsujimoto, 2022



A capacidade de quelar ferro presente nos hidrolisados é interessante, pois podem apresentar papel crucial no controle do estresse oxidativo, visto que o acúmulo desses metais de transição pode gerar este estresse, relacionado a diversas patologias, como doenças generativas, doenças cardiovasculares, hiperglicemia entre outros (JOMOVA; VALKO, 2011). Também tem sido indicada na obtenção de quelatos ferro peptídeos pré-sintetizados como uma promissora fonte dietética de ferro.(LEITE; FRASSON, 2017).

5. CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos foi possível concluir que, o processo de obtenção de hidrolisados proteicos através da hidrólise da caseína e da ovoalbumina com a ficina, é uma proposta interessante, visto que os que os peptídeos bioativos de ambas apresentam capacidade atividade antioxidante e quelante de metais.

A atividade antioxidante tem um potencial para ser explorada na aplicação como alimento funcional, nutracêutico e conservante. A ingestão dietética dos hidrolisados associada à uma alimentação equilibrada tem potencial para ajudar a prevenir o estresse oxidativo associado ao surgimento de diversas doenças crônicas.

Assim como a atividade quelante de metais também seria uma opção para a conservação de alimentos, visto que os metais como o ferro são necessários para o crescimento de microrganismos patogênicos; dessa forma podendo aumentar vida de prateleira dos alimentos processados. A utilização dos hidrolisados também pode ser utilizada como uma fonte dietética de ferro mais biodisponível, ou seja, a ingestão dietética dos quelatos ferro-peptídeos poderiam auxiliar em um maior aproveitamento desse mineral.

Além disso, há o fato de que trabalhos do segmento de caracterização de enzimas e hidrolisados podem auxiliar em desenvolvimentos futuros de novas pesquisas e tecnologias, que serão úteis e benéficas à população.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADRIANO, Wellington Sabino. **Preparação e caracterização de derivados de enzimas industriais em quitosana**. Tese (Doutorado) – engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR, 2008.

BAIDAMSHINA, Diana R.; TRIZNA, Elena Y.; HOLYAVKA, Marina G.; BOGACHEV, Mikhail I.; ARTYUKHOV, Valeriy G.; AKHATOVA, Farida S.; ROZHINA, Elvira V.; FAKHRULLIN, Rawil F.; KAYUMOV, Airat R. Targeting microbial biofilms using Ficin, a nonspecific plant protease. **Scientific Reports**, v. 7, 46068, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep46068>.

BRASIL, Rafaella Belchior; NICOLAU, Edmar Soares; CABRAL, Jakeline Fernandes; SILVA, Marco Antônio Pereira Da. Estrutura e estabilidade das micelas de caseína do leite bovino. **Ciência Animal**, v. 25, n. 2, p. 71–80, 2015.

CHAKRABARTI, Subhadeep; GUHA, Snigdha; MAJUMDER, Kaustav. **Food-derived bioactive peptides in human health: Challenges and opportunities**. **Nutrients**, v. 10, n. 11, 1738, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu10111738>.

CONTRERAS, María del Mar; HERNÁNDEZ-LEDESMA, Blanca; AMIGO, Lourdes; MARTÍN-ÁLVAREZ, Pedro J.; RECIO, Isidra. Production of antioxidant hydrolyzates from a whey protein concentrate with thermolysin: Optimization by response surface methodology. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 1, p. 9–15, 2011. DOI: <https://10.1016/j.lwt.2010.06.017>.

CORDEIRO DA SILVA, Emanuel Isaque. Produção mundial de Leite em 2018: análise sobre o crescente aumento da produção e da produtividade. In: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco. **A nova pecuária leiteira mundial – produção mundial**, Campus Belo Jardim, PE: UFRPE, 2019.

DE GOBBA, Cristian; ESPEJO-CARPIO, F. Javier; SKIBSTED, Leif H.; OTTE, Jeanette. Antioxidant peptides from goat milk protein fractions hydrolysed by two commercial proteases. **International Dairy Journal**, v. 39, n. 1, p. 28–40, 2014. DOI: 10.1016/j.idairyj.2014.03.015.

FONSECA Renata Aline dos Santos. **Atividade antioxidante de peptídeos provenientes de hidrolisado proteico de bijupirá (Rachycentron canadum)**. Tese (Doutorado) Engenharia e Ciências de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, rio Grande, 2014. <http://repositorio.furg.br/handle/1/6086>.

JOMOVA, Klaudia; VALKO, Marian. **Advances in metal-induced oxidative stress and human disease**. **Toxicology**, v. 283, n. 2-3, p. 65-87, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.03.001>.

LEITE, Damaris Beraldi Godoy; FRASSON, Antonio Carlos organizadores. **Desafios da ciência e tecnologia de alimentos 2**. Curitiba, PR: Atena, 2017. 221 p.; 592 kbytes. (Desafios da Ciência e Tecnologia de Alimentos ; v. 2).

<https://www.atenaeditora.com.br/arquivos/ebooks/desafios-da-ciencia-e-tecnologia-de-alimentos-2>.

LEONEL, Sarita; SAMPAIO, Aloísio Costa organizadores. **A figueira**. São Paulo: Editora Unesp, 2011. 396 p. ISBN 9788539301874. Disponível em: <http://editoraunesp.com.br/catalogo/9788539301874,a-figueira>.

LIVNEY, Yoav D. **Milk proteins as vehicles for bioactives**. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, v. 15, n. 1-2, p. 73-83, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2009.11.002>.

LUIZ, Jorge; POSSAS, Santos. **Pré validação do ensaio imunoenzimático para quantificação do teor de ovoalbumina na vacina contra febre amarela**. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Vigilância Sanitária) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2012. 48 f. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/18477>.

MARQUES, Maria Risoleta Freire. **Bioquímica**. Florianópolis, SC: UFSC, 2014.

MARQUES, Rodolfo Ferreira. **Ação de Enzimas de Origem Vegetal (Bromelina e Ficina) sobre anticorpos produzidos por cavalos imunizados com veneno de *Bothrops jararaca***. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, (USP), 2016. <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9135/tde-04082016-144215/pt-br.php>.

MAZORRA-MANZANO, M. A.; RAMÍREZ-SUAREZ, J. C.; YADA, R. Y. **Plant proteases for bioactive peptides release: A review**. *Crit Rev Food Sci Nutr*. V. 58, n. 13, p. 2147-2163, 2018. DOI: 10.1080/10408398.2017.2018.

MCILVAINE, T. C. **A buffer solution for colorimetric comparison**. *Journal of Biological Chemistry*, v. 49, n. 1, p. 183-186, 1921. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)86000-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)86000-8).

MEISEL, H.; FITZGERALD, R.J. **Biofunctional Peptides from Milk Proteins: Mineral Binding and Cytomodulatory Effects**. *Current Pharmaceutical Design*. *Current pharmaceutical design*, v. 9, n. 16, p. 1289–1295, 2003. <https://doi.org/10.2174/1381612033454847>.

MIWA, Adriana Cristina Poli. **Comparação e avaliação dos métodos colorimétricos utilizados para determinação de proteínas em lagoas de estabilização**. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, USP, 2003. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/18/18138/tde-17042006-142148/pt-br.php>.

MONTEIRO, Valdirene; SILVA, Roberto. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. **Revista Processos Químicos**, v. 3, p. 9–23, 2009. DOI: 10.19142/rpq.v3i5.83.

MORELLON-STERLING, Roberto; EL-SIAR, Hocine; TAVANO, Olga L.;

BERENGUER-MURCIA, Ángel; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, Roberto. **Ficin: A protease extract with relevance in biotechnology and biocatalysis International. Journal of Biological Macromolecules**, v.162, p. 394–404, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.144>.

PACHECO, Maria Teresa Bertoldo; DIAS, Nádia F. G.; BALDINI, Vera Lúcia S.; TANIKAWA, C.; SGARBIERI, Valdemiro C. Propriedades funcionais de hidrolisados obtidos a partir de concentrados protéicos de soro de leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 2, p. 333–338, 2005. Disponível em: DOI: <https://doi.org/10.1590/S0101-20612005000200026>.

PARK, Young Woo; NAM, Myoung Soo. Bioactive Peptides in Milk and Dairy Products: A Review. **Korean Journal for Food Science of Animal Resources**, v. 35, n. 6, p. 831–840, 2015. DOI: 10.5851/kosfa.2015.35.6.831.

PÉREZ-JIMÉNEZ, Jara; SAURA-CALIXTO, Fulgencio. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. **Food Research International**, v. 39, n. 7, p. 791–800, 2006. DOI: 10.1016/j.foodres.2006.02.003.

POSSAS, Jorge Luiz dos Santos. **Pré-validação do ensaio imunoenzimático de quantificação do teor de ovoalbumina na vacina contra febre amarela**. 2012. 48 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Vigilância Sanitária) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2012. <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/18477>.

RAHMAN, N. N.; KHAN, M.; HASAN, R. **Bioactive components from Ficus glomerata**. **Pure & Appl. Chem.**, v. 66, n. 10/11, p. 2287-2290, 1994. <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1351/pac199466102287/html>.

RIBEIRO, Juliana Vila Verde. **Estudo das atividades biológicas de frações proteicas do feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) cultivar pérola**. 2017. 97 p. Dissertação (Mestrado em Biologia) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2017. <http://repositorio.bc.ufg.br/tede/handle/tede/8234>.

SANTOS, Romeu Moreira. **Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**. 2017. 21 p. Disponível em: <https://www.fcav.unesp.br/Home/departamentos/patologia/HELIOJOSEMONTASSIER/sds-page-aula-imuno-vet.pdf>.

SGARBIERI, Valdemiro Carlos. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutricao**, v. 17, n. 4, p. 397–409, 2004. DOI: 10.1590/s1415-52732004000400001.

SILVA, Elisangela Teixeira. **Estabilização de proteases para aplicação tecnológica**. 2013. 70 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais) - Universidade Católica de Pernambuco, Recife, 2013. <http://tede2.unicap.br:8080/handle/tede/630>.

STALDEMAN, William J.; COTTERILL, Owen J. editors. **Egg Science and Technology**. 4th. ed. New York, N.Y.: Routledge, 1995. ISBN: 978-1560228554.

TARDIOLI, Paulo W.; PEDROCHE, Justo; GIORDANO, Raquel L. C.; FERNÁNDEZLAFUENTE, Roberto; GUISÁN, José M. Hydrolysis of proteins by immobilizedstabilized Alcalase-glyoxyl agarose. **Biotechnology Progress**, v. 19, n. 2, p. 352–360, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1021/bp025588n>.

VIDOVIC, Damir; GRADDIS, Thomas; CHEN, Feng; SLAGLE, Paul; DIEGEL, Michael; STEPAN, Lara; LAUS, Reiner. Antitumor vaccination with HER-2-derived recombinant antigens. **International Journal of Cancer**, v. 102, n. 6, p. 660–664, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1002/ijc.10785>.

VOET, Donald; VOET, Judith G. Introdução ao estudo das enzimas. In: VOET, Donald; VOET, Judith G. **Bioquímica**. Porto Alegre: Artmed, 2013. p. 196–235. Disponível em: <https://www.mendeley.com/catalogue/introdução-ao-estudo-das-enzimas/>.

ZHANG, Lei; LI, Jianrong; HOGAN, Shelly; CHUNG, Hyun; WELBAUM, Gregory E.; ZHOU, Kequan. Inhibitory effect of raspberries on starch digestive enzyme and their antioxidant properties and phenolic composition. **Food Chemistry**, v. 119, n. 2, p. 592–599, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.06.063>.