



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

ALANA EMILIA SOARES DE FRANÇA QUEIROZ

Avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante de peptídeos obtidos através
da hidrólise de caseínas bovinas por proteases do látex da jaca (*Artocarpus
heterophyllus* Lam.)

RECIFE – PE
2014

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIA ANIMAL

ALANA EMILIA SOARES DE FRANÇA QUEIROZ

Avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante de peptídeos obtidos através da hidrólise de caseínas bovinas por proteases do látex da jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito necessário para a obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal. Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra. Keila Aparecida Moreira – UAG/UFRPE

RECIFE – PE
2014

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

Parecer da comissão examinadora da defesa de dissertação de mestrado de

ALANA EMILIA SOARES DE FRANÇA QUEIROZ

Avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante de peptídeos obtidos através da hidrólise de caseínas bovinas por proteases do látex da jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.)

Área de concentração: Biotecnologia
Recife, 25 de Fevereiro de 2014.

Dissertação apresentada e aprovada pela comissão examinadora:

Profa. Dra. Keila Aparecida Moreira (Presidente)
Unidade Acadêmica de Garanhuns – UFRPE

Profa. Dra. Carolina de Albuquerque Lima Duarte (Membro Externo)
Campus Garanhuns – UPE

Profa. Dra. Raquel Pedrosa Bezerra (Membro Externo)
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – UFRPE

Profa. Dra. Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares (Membro Interno)
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – UFRPE

Q3a

Queiroz, Alana Emilia Soares de França

Avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante de peptídeos obtidos através da hidrólise de caseínas bovinas por proteases do látex da jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) / Alana Emilia Soares de França Queiroz. -- Recife, 2014. 68 f.: il.

Orientador (a): Keila Aparecida Moreira.

Dissertação (Pós-Graduação em Biociência Animal) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife, 2014.

Referências.

1. Caseína bovina
 2. Antioxidante
 3. Antimicrobiano
 4. Peptídeos bioativos
 5. *Artocarpus heterophyllus* Lam.
- I. Moreira, Keila Aparecida, orientadora II. Título

CDD 591.4

A Ernesto Soares de Mello (*in memoriam*), meu querido avô e exemplo maior de alegria e simplicidade.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus. Causa primária de todas as coisas, Aquele que é infinitamente sábio e bondoso. Se cheguei até aqui, foi por sua vontade e misericórdia. Diante de todas as dificuldades, me fez forte. Seu amparo nunca cessou. Muito obrigada!

Aos amigos e protetores espirituais. Por sempre se fazerem presentes nos momentos em que mais precisei: através de intuições, energias e forças quando pensei que não teria mais. Sei que estão sempre por perto!

Ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, seus professores, colaboradores e funcionários. Pelo apoio e ensinamento nas mais diversas situações.

Ao Centro Laboratorial de Apoio à Pesquisa da Unidade Acadêmica de Garanhuns (CENLAG/UAG). Pela infraestrutura, equipamentos e funcionários disponibilizados para que meu experimento fosse realizado.

À Profa. Dra. Keila Aparecida Moreira. Pela orientação e por ter acreditado em meu potencial desde os tempos da iniciação científica. Muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Renato José Reis Molica. Sua colaboração foi essencial para que eu pudesse realizar os experimentos no HPLC. Desculpe os vários e-mails sem hora e obrigada!

À Júlia Campos, técnica responsável pelas análises no espectrômetro de massas, no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE). Sempre muito prestativa nas diversas dúvidas que surgiam durante o caminho: meu obrigada! À Mariana Arruda, por sempre ter tido a paciência e boa vontade para explicar o passo-a-passo de algumas etapas realizadas neste trabalho. Obrigada!

À Maria Osita Soares de França e Antônio de Queiroz Viana, meus pais. Não há no dicionário palavra que eu possa utilizar para agradecer, na intensidade necessária, o que vocês fizeram e fazem por mim. Meus incentivadores, meus conselheiros e meus amados: muito obrigada!

A Ernesto Soares de Mello, vovô. Por ter sido o meu maior e melhor exemplo de bondade e simplicidade. O senhor me mostrou muitas coisas lindas, que carrego sempre comigo. Tento mirar-me sempre no seu exemplo. Saudades, vovô!

A Hugo Teixeira de Menezes. Seu apoio, seu amor e seu cuidado foram essenciais nesta caminhada. Você fez e faz parte de tudo isso. Você que escutou minhas dificuldades, que me ajudou a pensar melhor frente às diversas situações, que torce sempre por mim. Muito obrigada!

À Dona Lúcia, Seu Bené, Raul e Rui. Família que me acolheu em seu lar com tanto carinho quando precisei cursar as disciplinas do mestrado. Fizeram-me tão parte da família que hoje me sinto como tal. Serei eternamente grata!

Aos meus amados amigos que por muitas vezes não tiveram minha presença em suas vidas, mas que sempre me apoiaram: Camila Ladislau, Diego Moraes, Elizabeth Xavier, Heloísa Fernanda, Katarina Juliana, Laís Milena, Mariana Ladislau e Paulo Roberto. Sei que vocês entendem e agradeço imensamente a amizade de vocês!

Aos inúmeros amigos que conquistei através da pós-graduação: Alluanan Adelson, Giovana Anderlini, Ilka Dayanne, Jaciel Oliveira, Jéssica Santana e Maina Almeida. As disciplinas foram muito mais proveitosas com vocês!

Aos companheiros de jornada e laboratório: Amanda Sena, Anna Carolina, Andrezza Emanuella, José Erick, Mariana Sánchez, Sheylla Araújo e Talita Camila. Sempre é um aprendizado dividir o dia-a-dia com vocês. Vocês que ajudaram, tanto profissional quanto pessoalmente: obrigada por tudo!

Aos queridos estagiários e ex-estagiários do laboratório, em especial: Camilla Lira, Edson Flávio, Gilvannya Sobral, Ivaldo Almeida, Taffael Serra Azul e Wellington Leal. Sempre tão prestativos e amigos.

E, finalmente, a todos que contribuíram direta e indiretamente para mais uma etapa vencida...

Muito obrigada!

“O saber a gente aprende com os mestres e os livros. A sabedoria, se aprende é com a vida e com os humildes.”

Cora Coralina

RESUMO

Através da hidrólise das proteínas do leite por proteases que podem ser de origem animal, microbiana ou vegetal, é possível que haja a liberação de peptídeos chamados bioativos, que podem apresentar atividades biológicas importantes. Dessa forma, objetivou-se com este estudo avaliar a atividade antimicrobiana e antioxidante de peptídeos obtidos através da hidrólise de caseínas bovinas por proteases do látex da jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.). A hidrólise das caseínas bovinas pelo extrato enzimático da jaca foi avaliada utilizando planejamento fatorial 2^3 , no qual foram observados os efeitos da relação enzima:substrato (1:50; 1:100 e 1:150), temperatura (28, 34 e 40 °C) e tempo de hidrólise (8, 16 e 24 horas), sob o grau de hidrólise (%). O hidrolisado com maior grau de hidrólise foi selecionado para fracionamento através de cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa. As frações obtidas, bem como o hidrolisado, foram avaliados quanto ao potencial antimicrobiano frente *Staphylococcus aureus* UFPEDA 02, *Enterococcus faecalis* UFPEDA 138, *Bacillus subtilis* UFPEDA 86, *Escherichia coli* UFPEDA 224, *Klebsiella pneumoniae* UFPEDA 396 e *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 416; avaliação do potencial antioxidante, através da captura do radical ABTS^{•+} e determinação da atividade quelante de Cu^{2+} , com utilização do violeta de pirocatecol. O hidrolisado resultante do ensaio constituído por relação enzima:substrato de 1:50, temperatura de 40 °C e tempo de hidrólise de 24 horas apresentou maior grau de hidrólise (37,84±1,68%), atividade antimicrobiana frente *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*; maior atividade antioxidante a 5 mg/mL com 95,08±0,46%; e atividade quelante variando de 32,38±2,79 a 18,59±1,46%. As 16 frações obtidas do fracionamento apresentaram atividade contra pelo menos um micro-organismo; maior atividade antioxidante na fração FH9 (94,94±0,60%); e atividade quelante de Cu^{2+} nas frações FH2, FH9, FH12 e FH13, com FH12 e FH9 apresentando melhores resultados, com 28,28±4,41 e 18,50±1,15%, respectivamente. Os peptídeos gerados neste estudo apresentaram atividade biológica, com possíveis aplicações na formulação de alimentos funcionais e no desenvolvimento de fármacos.

Palavras-chave: caseína bovina; antioxidante; antimicrobiano; peptídeos bioativos

ABSTRACT

Through hydrolysis of milk proteins by proteases that may be animal, microbial or plant origin, it is possible that the release of bioactive peptides called, which may have important biological activities. Thus, the aim of this study was to evaluate the antimicrobial and antioxidant activity of peptides obtained by hydrolysis of bovine casein by proteases latex jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam). Hydrolysis of bovine caseins by enzyme extract of jackfruit was assessed using 2^3 factorial design, in which the effect of the enzyme were observed relationship enzyme:substrate (1:50, 1:100 and 1:150), temperature (28 , 34 and 40 °C) and hydrolysis time (8, 16, and 24 hours), under the degree of hydrolysis (%). The hydrolyzate with a higher degree of hydrolysis is selected for fractionation by liquid chromatography in reverse phase high efficiency. Fractions obtained and hydrolyzate were evaluated concerning antimicrobial potential front *Staphylococcus aureus* UFPEDA 02, *Enterococcus faecalis* UFPEDA 138, *Bacillus subtilis* UFPEDA 86, *Escherichia coli* UFPEDA 224, *Klebsiella pneumoniae* UFPEDA 396 and *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 416; Antioxidant potential by capturing the radical ABTS^{•+} and determination of Cu²⁺ chelating activity, using the pyrocatechol violet. The resulting hydrolyzate test consisting of enzyme:substrate ratio 1:50, temperature 40 °C and hydrolysis time 24 hours had a greater degree of the hydrolysis (37.84±1.68%), antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae*; higher antioxidant activity than 5 mg/mL to 95.08±0.46%, and chelating activity ranging from 32.38±2.79 to 18.59±1.46%. The 16 fractions obtained from fractionation showed activity against at least one microorganism; higher antioxidant activity in FH9 fraction (94.94±0.60%) and Cu²⁺ chelating activity in fractions FH2 , FH9 , FH12 and FH13; with FH12 and FH9 showing better results, with 28.28±4.41 and 18.50±1.15% , respectively. The peptides generated in this study showed biological activity, with possible applications in the formulation of functional foods and the development of pharmaceuticals.

Keywords: bovine casein, antioxidant, antimicrobial, bioactive peptides

SUMÁRIO

RESUMO	
ABSTRACT	
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	12
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 Leite	14
2.2 Caseínas.....	15
2.3 Peptídeos bioativos	18
2.4 Peptídeos antimicrobianos (PAMs).....	19
2.5 Peptídeos antioxidantes.....	23
2.6 Gênero <i>Artocarpus</i>	24
2.7 Jaqueira (<i>Artocarpus heterophyllus</i> Lam.).....	24
2.8 Proteases.....	27
2.9 Proteases vegetais	28
3. OBJETIVOS	30
3.1 Objetivo geral	30
3.2 Objetivos específicos	30
4. REFERÊNCIAS.....	31
5. CAPÍTULO I	37
SUMÁRIO INTERPRETATIVO.....	38
RESUMO.....	39
INTRODUÇÃO	40
MATERIAIS E MÉTODOS	41
RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
CONCLUSÃO.....	54
AGRADECIMENTOS.....	54
REFERÊNCIAS	55
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	68

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1. Corte transversal de uma micela de caseína.....	16
Figura 2. Principais funções dos peptídeos bioativos derivados de caseína	19
Figura 3. Modelos de indução à morte celular por peptídeos antimicrobianos. Modelo <i>barrel stave</i> (A); Modelo <i>carpet</i> (B); e Modelo <i>toroidal</i> (C). Regiões hidrofóbicas dos peptídeos estão coloridas em azul e as hidrolíticas, coloridas em vermelho.....	22
Figura 4. Jaqueira (<i>Artocarpus heterophyllus</i> Lam.) com vários frutos em diferentes estágios de frutificação.....	26

CAPITULO I

Figura 1. Perfil eletroforético em SDS-PAGE (A) e zimograma na presença de gelatina a 0,1% (B) do extrato da jaca (EJ).....	64
Figura 2. Perfil eletroforético em Tricina-SDS-PAGE da caseína não hidrolisada (CN), dos hidrolisados H1-H4 (A), H5-H8 (B) e H9-H11 (C) gerados a partir da hidrólise das caseínas pelo extrato enzimático da jaca (<i>Artocarpus heterophyllus</i> Lam.).....	65
Figura 3. Cromatografia líquida de alta eficiência do hidrolisado H4, com as frações coletadas FH1-FH3 (A), FH4-FH14 (B) e FH15-FH16 (C) circuladas em preto.....	66
Figura 4. Gráfico de Pareto dos efeitos das variáveis relação enzima:substrato, temperatura (°C) e tempo de hidrólise (h) e interações sob o grau de hidrólise das caseínas bovinas por proteases do látex da jaca (<i>Artocarpus heterophyllus</i> Lam.).....	67

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1. Características das principais frações da caseína bovina.....	17
--	----

CAPITULO I

Tabela 1. Matriz do planejamento fatorial 2^3 para avaliação dos efeitos de parâmetros sob o grau de hidrólise (%) da caseína bovina pelo extrato enzimático da jaca (<i>Artocarpus heterophyllus</i> Lam.).....	60
Tabela 2. Matriz do planejamento fatorial 2^3 com as diferentes combinações de ensaios realizados (H1-H12) e resultado da variável resposta.....	60
Tabela 3. Atividade antimicrobiana do hidrolisado H4, constituído pela relação enzima:substrato 1:50, temperatura a 40 °C e tempo de hidrólise 24 h frente à bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.....	61
Tabela 4. Atividade antioxidante do hidrolisado H4, constituído pela relação enzima:substrato 1:50, temperatura a 40 °C e tempo de hidrólise 24 h, em várias concentrações. Valores de atividade antioxidante são expressos em (%) e atividade antioxidante equivalente ao Trolox (AAET).....	61
Tabela 5. Atividade antimicrobiana das frações (FH1-FH16) coletadas por HPLC do hidrolisado H4, frente às bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.....	62
Tabela 6. Atividade antioxidante das frações (FH1-FH16) coletadas por HPLC do hidrolisado H4. Valores de atividade antioxidante são expressos em (%) e atividade antioxidante equivalente ao Trolox (AAET).....	62
Tabela 7. Atividade quelante de Cu^{2+} do hidrolisado H4, constituído pela relação enzima:substrato 1:50, temperatura a 40 °C e tempo de hidrólise 24 h, em várias concentrações. Valores de atividade quelante são expressos em (%).....	63
Tabela 8. Atividade quelante de Cu^{2+} das frações (FH1-FH16) coletadas por HPLC do hidrolisado H4. Valores de atividade antioxidante são expressos em (%) e atividade antioxidante equivalente ao Trolox (AAET).....	63

1. INTRODUÇÃO

O leite é conhecido como o alimento mais completo da natureza. Ao longo dos anos, a visão tradicional e contemporânea do papel do leite tem se expandido notadamente, além do conhecido alimento de subsistência para crianças. Fora as propriedades nutricionais, o leite apresenta-se ainda como uma fonte de compostos biologicamente ativos, a exemplo dos peptídeos que podem ser obtidos através das proteínas encontradas em sua composição, como as proteínas do soro e as caseínas (GOBBETTI et al., 2007).

Vários pesquisadores na última década têm demonstrado que esses peptídeos bioativos possuem funcionalidades de grande importância biológica, incluindo atividades antimicrobiana, anti-hipertensiva, antioxidante, anticitotóxica, imunomodulatória, opioide e carreadora de minerais (PARK, 2009; PIHLANTO; VIRTANEN; KORHONEN, 2010; MARTÍNEZ-MARQUEDA et al., 2013).

A grande maioria destes peptídeos está em estado de latência dentro das proteínas nativas, e, quando liberados, chegam a conter de 3 a 20 aminoácidos por molécula. Podem ser liberados durante a digestão enzimática, durante o processamento de alimentos, ou por hidrólise intermediada por enzimas microbianas e de plantas (KORHONEN; PIHLANTO-LEPÄLLÄ, 2004).

Essa hidrólise proteica capaz de gerar peptídeos funcionais é realizada por proteases, que são enzimas capazes de quebrar as ligações peptídicas que podem atuar perto das extremidades das cadeias polipeptídicas, sendo denominada de exopeptidase; ou dentro delas, chamando-se endopeptidase (PALMA et al., 2002).

Essas proteases podem ser obtidas de várias fontes. Nesse sentido, o gênero vegetal *Artocarpus*, que abrange uma vasta área em todo o mundo, tem sido utilizado para obtenção de proteases com aplicação em indústrias alimentícias e farmacêuticas, caracterizando-se em uma fonte de fácil disponibilidade (BALQIS; ROSMA, 2011).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana e antioxidante de peptídeos obtidos através da hidrólise de caseína bovina por proteases do látex da jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Leite

Considerado um dos nutrientes mais importantes para os seres humanos durante a vida, em que há consumo do início até idade mais avançada, o leite é um dos principais recursos alimentares para os seres humanos, levando em consideração também seus derivados, como o queijo e alguns produtos advindos de processos de fermentação e transformação (RONCADA et al., 2012).

Por definição, o leite é um fluido corporal complexo, sendo um excelente nutriente para os recém-nascidos mamíferos. Por esta razão, o leite contém diversas proteínas que são secretadas com funções diferentes: proteínas nutricionais; de caráter antimicrobiano; além citocinas e quimiocinas, por exemplo. Todas essas proteínas são essenciais aos recém-nascidos ao entrarem em contato com os desafios ambientais, como as infecções (LÖNNERDAL, 2010).

Em tecnologia de produtos lácteos, a terminologia “leite” refere-se exclusivamente ao leite de vaca; misturado, por ser coletado de um grande número de vacas saudáveis, e sem fraudes, ou seja, sem alterações em sua composição original. O leite obtido de outras fontes deve ser rotulado de acordo com a espécie do animal (JOST, 2012).

O leite integral apresenta-se como um sistema coloidal composto por uma fase aquosa contínua, em que a lactose, as proteínas do soro do leite e os minerais estão dissolvidos; e outra fase dispersa, composta por micelas de caseína e pelos glóbulos de gordura (JOST, 2012). Possui em sua composição cerca de 3,5% de proteína, que consiste em caseínas (80%) e proteínas do soro (20%). As caseínas ainda podem ser classificadas como α -caseína, β -caseína e κ -caseína. O soro do leite possui α -lactoalbumina, β -lactoglobulina, imunoglobulinas, soroalbuminas e proteínas menores, que apresentam diversas atividades biológicas (PIHLANTO-LEPPÄLÄ, 1999).

A composição quantitativa destes elementos sofre alterações, principalmente entre espécies geneticamente diferentes e entre raças, assim como diferenças inerentes à cada animal, mesmo pertencentes à mesma raça. O fator ambiental

também contribui, como a alimentação fornecida ao animal, em relação às concentrações de proteína e gordura; o período de lactação, dentre outros (MICHAELIDOU, 2008).

Por essa composição, o leite bovino é considerado uma importante fonte natural de componentes biologicamente ativos, juntamente com o colostro. Nas últimas duas décadas, grande avanço tem sido realizado, no que diz respeito à ciência, tecnologia e às aplicações comerciais dos componentes bioativos presentes no leite (KORHONEN, 2009a).

Particularmente, as proteínas derivadas do leite são consideradas como a fonte mais importante de peptídeos bioativos, que podem ser gerados através da hidrólise de caseínas por proteases (KORHONEN; PIHLANTO, 2006).

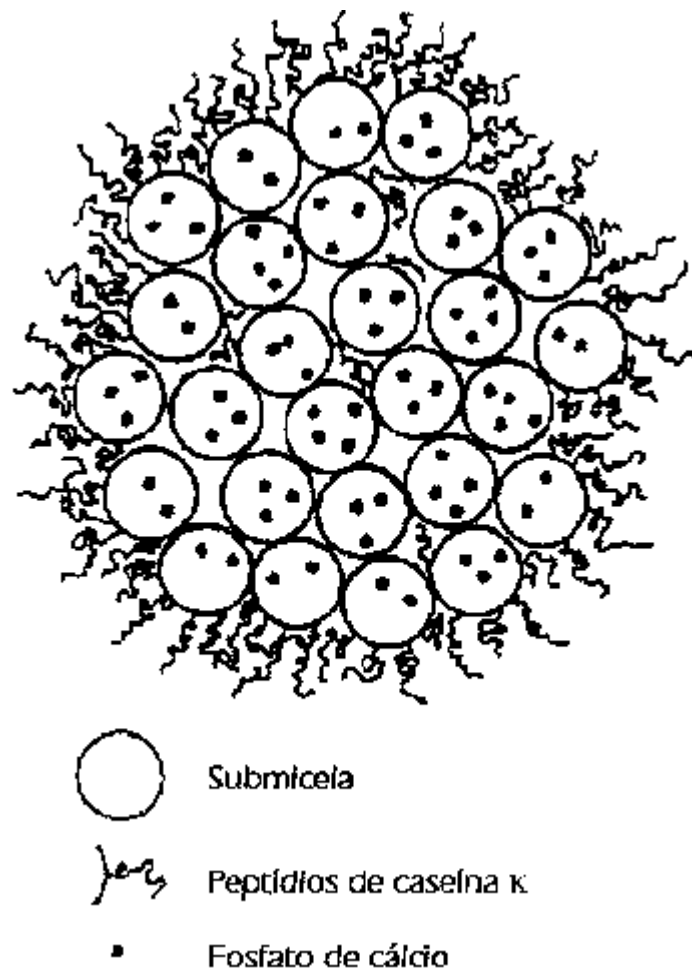
2.2Caseínas

A caseína é considerada o principal componente proteico do leite, chegando a constituir aproximadamente 80% da fração total de proteínas (OLALLA et al., 2009). Constitui um grupo heterogêneo de fosfoproteínas que estabiliza o fosfato de cálcio em grandes agregados coloidais, chamados de micelas de caseína. No leite, cerca de 95% das caseínas presentes encontram-se nestes agregados coloidais (FOX; BRODKORB, 2008).

Micelas de caseína apresentam alto grau de material inorgânico, formado principalmente por íons de cálcio e fosfato (ALVAREZ et al., 2007). Apesar da estrutura das micelas não estar bem estabelecida, é aceito que são partículas esféricas com diâmetros externos variando de 50 a 500 nm (DALGLEISH, SPAGNUOLO, GOFF, 2004; BELICIU, MORARU, 2009) e em vários trabalhos o núcleo é descrito como uma rede homogênea de moléculas individuais de caseínas, em que pequenos aglomerados de fosfato de cálcio são uniformemente distribuídos (MCMAHON; OOMMEN, 2008).

Externamente, considera-se que a micela é constituída de frações de κ -caseína que se estendem para a fase aquosa do meio, assemelhando-se a uma escova polieletrólita, que produz repulsões de curto alcance entre micelas (TUINIER; DE KRUIF, 2002). Na Figura 1, observa-se corte transversal de uma micela,

mostrando a estrutura em submicelas, cadeias polipeptídicas de κ -caseína na face externa da micela e os aglomerados de fosfato de cálcio que servem como material aderente para manutenção da ordem das submicelas.



Fonte: SGARBIERI (2005).

Figura 1. Corte transversal de uma micela de caseína.

A caseína ainda pode ser separada em várias frações eletroforéticas ou tipos de cadeias polipeptídicas principais, que são conhecidas por α -caseína, β -caseína, κ -caseína e γ -caseína, que diferem na sua estrutura primária, secundária e terciária, além de sua massa molecular (GHOSH et al., 2009). As α -caseínas ainda formam uma família de proteínas com características diferentes, sendo separadas em

frações α_{s1} e α_{s2} . Dentro de cada grupo de caseínas aparecem ainda variantes genéticas, de acordo com a espécie e raça animal (SGARBIERI, 2005). As características físico-químicas das principais frações da caseína também diferem e são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Características das principais frações da caseína bovina.

Fração da caseína	% no leite desnatado	pH no ponto isoelétrico	Massa Molecular (Da)
Caseína α_{s1}	45-55	4,1	23.613
β -caseína	25-35	4,5	24.000
κ -caseína	8-15	4,1	19.000
γ -caseína	3-7	5,8	21.000

Fonte: SGARBIERI, 2005 (Adaptado).

Além dessas diferenças, as frações da caseína podem apresentar conteúdo de aminoácidos diferente. Um exemplo é que somente as frações α_{s2} e κ contêm cisteína. Este resíduo forma pontes de dissulfeto intermoleculares e a ausência dele, como observado nas frações α_{s1} e β , permite uma maior flexibilidade nessas moléculas. As caseínas, especialmente a β -caseína, são proteínas de cadeias abertas e com predominância de estruturas primárias o que se deve, em parte, ao conteúdo de prolina distribuída na cadeia polipeptídica, prevenindo a formação de estruturas secundárias (DICKINSON, 1999).

Em indústrias as caseínas são utilizadas por suas propriedades físico-químicas, nutricionais e funcionais (RUIS et al., 2007; BELICIU, MORARU, 2013; MCCARTHY et al., 2014); quando utilizadas para obtenção de peptídeos bioativos, a se apresentam como uma fonte destes em potencial (CHANG et al., 2013; YAMADA et al., 2013; WU et al., 2013).

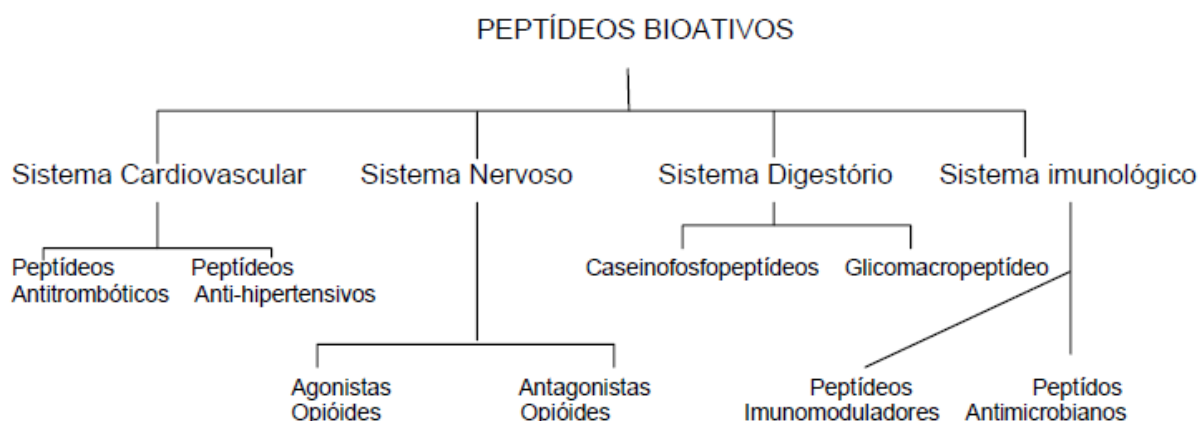
2.3 Peptídeos bioativos

Substâncias consideradas bioativas, de origem alimentar, são definidas como componentes dos alimentos consumidos que podem vir a exercer atividades regulatórias no organismo, independente de suas características nutricionais (MEISEL, 1999).

Alguns peptídeos podem apresentar atividades biológicas e, quando apresentam, são chamados de bioativos. Estes peptídeos são sequências de aminoácidos que nas proteínas nativas se encontram inativas, contudo após o processo de hidrólise, seja ele *in vitro* ou *in vivo*, tornam-se ativas e passam a alterar respostas fisiológicas no organismo animal. Várias funções podem ser realizadas por estes peptídeos, como atividades imunomoduladora, anti-ulcerativa, anti-hipertensiva, anticariogênica, anticoagulante, opioide e hipocolesterolêmica (CHATTERTON et al., 2006; HARTMANN; MEISEL, 2007).

Estes peptídeos podem ser encontrados em vários organismos animais e obtidos a partir de hidrólise enzimática de proteínas de origem vegetal e animal, sendo esta última bastante estudada, principalmente pelo destaque dado aos peptídeos originados do leite e de seus derivados; entretanto ainda pode-se citar a utilização de outros alimentos de origem animal como ovos, carnes e peixes (HARTMANN; MEISEL, 2007). Diversas funcionalidades já foram encontradas em peptídeos derivados da caseína que podem exercer funções em diferentes sistemas do organismo, conforme esquema apresentado na Figura 2.

A atividade destes peptídeos se baseia, dentre outros fatores, na composição de aminoácidos e na sequência destes, inerente a cada peptídeo funcional. O tamanho das sequências ativas pode variar de 2 a 20 resíduos de aminoácidos e muitos peptídeos são conhecidos por apresentarem propriedades multifuncionais. Por essas razões, peptídeos bioativos derivados do leite e de suas proteínas, são considerados proeminentes candidatos para utilização em alimentos funcionais, promovendo a saúde do coração, ossos, sistema digestório e do sistema imune; além de modular o humor e promover o controle do estresse (KORHONEN, 2009b).



Fonte: Silva; Malcata, 2005 (Adaptado).

Figura 2. Principais funções dos peptídeos bioativos derivados de caseína.

Esses peptídeos também podem atuar como agentes antimicrobianos, participando na defesa do organismo contra patógenos invasores (PELLEGRINI, 2003) e como antioxidantes (SARMADI; ISMAIL, 2010).

2.4 Peptídeos antimicrobianos (PAMs)

Ao longo dos anos, vários micro-organismos começaram a apresentar alterações em seu metabolismo, conferindo-lhes multirresistência a um amplo espectro de antibióticos normalmente utilizados no tratamento de infecções. Um exemplo clássico, conhecido como o principal agente infeccioso envolvido em infecções hospitalares, *Staphylococcus aureus* MRSA (*Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina) surgiu em 1961, apenas dois anos após a introdução deste medicamento para combater cepas de *S. aureus* que apresentaram resistência à penicilina (ENRIGHT et al., 2002).

O surgimento de bactérias produtoras de carbapenemases, enzimas capazes de hidrolisar antibióticos carbapenêmicos, recentemente se tornou outro grande problema relacionado à falta de opções terapêuticas de combate a estes micro-organismos (HIRSCH; TAM, 2010). Estas enzimas, também chamadas de carbapenemase, são predominantemente encontradas em *Klebsiella pneumoniae*, contudo pode ser produzida por várias enterobactérias, incluindo *Enterobacter sp.*,

Escherichia coli, *Salmonella enterica*, dentre outras, além de bactérias Gram-negativas como *Pseudomonas aeruginosa* (QUEENAN; BUSH, 2007).

Sabe-se que o uso indiscriminado e incorreto de antibióticos tem levado ao surgimento dessas cepas de micro-organismos resistentes a antibioticoterapia convencional, caracterizando-se um grave problema de saúde pública e por este motivo, a busca por novas substâncias antibióticas se faz necessária (PARK et al., 2011).

Nesse contexto, em que o desenvolvimento de novos antibióticos parece ser essencial, proteínas e peptídeos se destacam por serem comumente encontrados na natureza e por pertencerem ao sistema imune inato de qualquer organismo. Proteínas e peptídeos de insetos, anfíbios, mamíferos, plantas e bactérias já foram isolados e avaliados quanto à atividade antimicrobiana (KAMYSZ, 2005).

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) são geralmente moléculas catiônicas que interagem com os fosfolipídios aniônicos da membrana microbiana, conferindo seletividade aos mesmos. Além da seletividade, a rara indução à resistência microbiana e a capacidade de sinergia com antibióticos convencionais tornam os PAMs atrativos, como agentes antimicrobianos (PALUMBO et al., 2010).

Os PAMs adotam com frequência estruturas anfipáticas, com suas subunidades hidrofóbicas lado a lado, as quais correspondem a mais de 50% de seus aminoácidos constitutivos. Dessa forma, quando catiônicos e hidrofóbicos, tendem a ter maior facilidade em interagir e se inserir em paredes celulares aniônicas ou em membranas fosfolipídicas dos micro-organismos (BROWN; HANCOCK, 2006).

Podem ser classificados de acordo com seu desdobramento estrutural como α -hélice, folha- β , estendido e alça; e caracterizados de acordo com suas propriedades físico-químicas como carga, hidrofobicidade, sequência e anfipaticidade (PETERS et al., 2010).

A atividade antimicrobiana destes peptídeos pode ser resultado da perturbação da integridade da membrana celular através de interações eletrostáticas e hidrofóbicas que levam à formação de poros na membrana, apesar de poderem agir em múltiplos alvos da célula (HUANG; HUANG; CHEN, 2010).

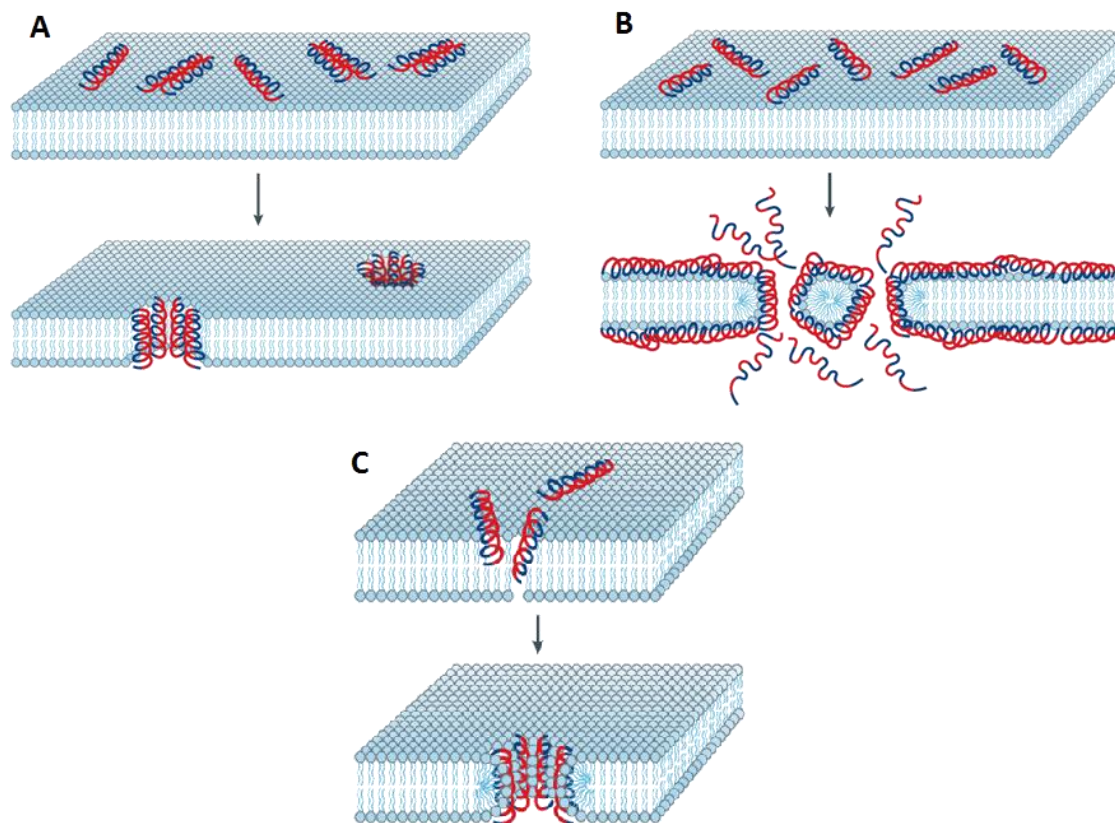
Alguns modelos de inserção e permeabilização das membranas plasmáticas dos micro-organismos pelos PAMs foram criados a fim de explicar o mecanismo de ação que confere aos peptídeos o caráter antimicrobiano. É conhecido que em etapa anterior à inserção dos peptídeos nas membranas plasmáticas dos micro-organismos há a atração destes pela membrana, em que os PAMs catiônicos são eletrostaticamente atraídos pelas cargas negativas do envelope externo de bactérias Gram-negativas; e dos fosfolipídios aniônicos e grupos fosfatos na superfície das bactérias Gram-positivas (BROGDEN, 2005).

Existem três modelos propostos pela literatura. O modelo *Barrel stave* (Figura 3A) ocorre através de fixação dos peptídeos em hélice nas membranas plasmáticas, formando um feixe na membrana com um lúmen central, assemelhando-se a um barril, onde as regiões hidrofóbicas dos peptídeos se alinham com o núcleo lipídico da bicamada da membrana, ao passo que a face hidrofílica do peptídeo forma a porção interna de um poro aquoso (BROGDEN, 2005). Esse tipo de mecanismo leva à morte da célula por extravasamento do conteúdo celular (NASCIMENTO et al., 2003).

Enquanto que no modelo *carpet* (Figura 3B) há o acúmulo de peptídeos na superfície da bicamada, que se orientam paralelamente à superfície da membrana, sendo atraídos eletrostaticamente por elas, de modo que sua porção hidrofílica sofra atração pelas cabeças aniônicas dos grupos fosfolipídicos em inúmeros locais que recobrem a superfície da membrana, formando uma espécie de tapete. Em altas concentrações de peptídeos, estes orientados paralelamente à superfície, são então reorientados, de forma que sua porção hidrofílica se direcione ao centro hidrofóbico da membrana, mantendo ainda contato com as cabeças aniônicas dos grupos fosfolipídicos (BROGDEN, 2005). Semelhante a uma ação detergente e levando à formação de micelas, os peptídeos causarão perturbação na bicamada, com a desagregação da membrana (NASCIMENTO et al., 2003).

Em relação ao modelo *toroidal* (Figura 3C), os peptídeos em α -hélice se orientam paralelamente à membrana e, após atingirem um limiar de concentração, inserem-se de forma perpendicular à camada lipídica, induzindo as monocamadas a se dobrarem continuamente através dos poros de modo que o núcleo aquoso esteja revestido pelos peptídeos inseridos e pelas cabeças dos grupos lipídicos. Na

formação do poro *toroidal*, as faces polares dos peptídeos associam-se com as cabeças polares dos grupos lipídicos.



Fonte: Brogden, 2005 (Adaptado).

Figura 3. Modelos de indução a morte celular por peptídeos antimicrobianos. Modelo *barrel stave* (A); Modelo *carpet* (B); e Modelo *toroidal* (C). Regiões hidrofóbicas dos peptídeos estão coloridas em azul e as hidrofílicas, coloridas em vermelho.

Ao final do processo ocorre a formação de um poro aquoso de meia-vida curta, íon seletivo, cuja parede é constituída por monômeros do peptídeo intercalados com lipídios da membrana biológica. O modelo *toroidal* difere do *barrel stave*, pois os monômeros dos peptídeos estão sempre associados às cabeças dos grupos lipídicos (BROGDEN, 2005). Esses peptídeos com atividade antimicrobiana também podem ser caracterizados como multifuncionais, quando apresentam mais de uma atividade biológica, como a atividade antioxidante (WU et al., 2013).

2.5 Peptídeos antioxidantes

Uma gama de espécies reativas de oxigênio, que incluem radicais livres como o ânion superóxido ($O_2^\bullet$), radicais hidroxila ($\bullet HO$) e radicais não-livres, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio singlete (1O_2), podem ser formados no corpo humano e em alimentos (PERJES et al., 2012). Estes radicais não só induzem a peroxidação lipídica que causa deterioração de alimentos, mas também danos oxidativos em biomoléculas, que pode levar à morte da célula, dano tecidual e doenças crônicas como aterosclerose, câncer, enfisema, cirrose e artrite (HE et al., 2012).

Antioxidantes são substâncias que atuam sob essas espécies reativas, impedindo a ação destas, e são definidos como compostos que quando presentes em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável são capazes de inibir ou retardar a sua oxidação (CORRÊA, 2013).

O interesse em encontrar esses antioxidantes vem aumentando ao longo dos anos, principalmente aqueles presentes em alimentos, pois é conhecido que podem proteger o corpo humano contra o ataque dos radicais livres e atrasar o progresso de muitas doenças crônicas, bem como impedir a oxidação lipídica em alimentos (KADRI et al., 2011).

Antioxidantes naturais, incluindo o ácido rosmarínico, catequina, tocoferóis, ácido ascórbico, entre vários extratos fenólicos advindos de plantas, são muito utilizados em alimentos processados, por exemplo. Contudo, a busca por antioxidantes naturais tem se estendido além dessas fontes tradicionais e vários estudos tem mostrados que peptídeos e hidrolisados de proteínas de origem vegetal e animal podem possuir atividade antioxidante significativa (XUE et al., 2009).

Das proteínas de origem animal, a caseína, bem como seus hidrolisados e peptídeos, é muito estudada quanto à atividade antioxidante (KIM; JANG; KIM, 2007), que pode estar relacionada à eliminação de radicais (XIE et al., 2013), à atividade quelante de íons (PHELAN et al., 2009) e à inibição da oxidação em lipídios.

Peptídeos com atividade antioxidante podem ser obtidos por hidrólise e são afetados diretamente pelo tipo de hidrólise por qual a proteína precursora passa.

Esses peptídeos podem ser produzidos a partir das seguintes formas: (a) hidrólise enzimática por enzimas digestivas, (b) fermentação de leite com culturas proteolíticas iniciadoras e; (c) proteólise através de enzimas produzidas por micro-organismos ou plantas (KORHONEN, 2009b).

2.6 Gênero *Artocarpus*

Dos gêneros de plantas mais utilizados como medicamentos e fontes de outros compostos naturais, destacam-se as do gênero *Morus*, *Ficus* e *Artocarpus*, por possuírem importantes metabólitos secundários com atividades biológicas úteis. Além disso, são fontes econômicas de alimento e são amplamente utilizadas na medicina, na agricultura e na indústria (JARRET, 1959).

As espécies pertencentes ao gênero *Artocarpus* apresentam vantagens em relação às demais, pela principal característica de ser uma espécie de dupla aptidão: servir como alimento, através de suas frutas, e para fins madeireiros. Estão presentes em uma grande variedade de nichos ecológicos de vários habitats e são diversas e numerosas em diferentes ecossistemas de florestas. Entretanto, a diversidade e o estado de conservação das *Artocarpus*, pertencentes à família Moraceae, não são uniformes em todo o mundo. Esta família é composta por 60 gêneros compreendendo 1.400 espécies distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais da Ásia (JAGTAP; BAPAT, 2010).

Como exemplos dessas espécies podem ser citadas *Artocarpus altilis*, conhecida como árvore-do-pão e seu fruto como “fruta-pão”; *Artocarpus chempeden*, frutífera distribuída na Ásia e Indonésia; e *Artocarpus heterophyllus* Lam., conhecida como “jaqueira” e seu fruto como “jaca” (JAGTAP; BAPAT, 2010).

2.7 Jaqueira (*Artocarpus heterophyllus* Lam.)

O Brasil é um dos três maiores produtores mundiais de frutas, com produção superior a 43 milhões de toneladas, superado apenas pela China e Índia (IBRAF, 2010). Em território nacional, a região Nordeste destaca-se como grande produtora de frutos advindos de espécies nativas e exóticas de clima tropical, e por apresentar

grande diversidade de espécies frutíferas que, quando exóticas, são conhecidas por grande adaptação às condições edafoclimáticas da região (ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2010).

A jaqueira (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) é um exemplo de espécie exótica, introduzida no Brasil ainda nos tempos coloniais na metade do século XVII (Figura 4). É originária da Índia, mas encontra-se presente em toda a Ásia (LORENZI et al., 2006).

É uma espécie arbórea, de grande porte, pertencente à família Moraceae (BALIGA et al., 2011). O fruto, conhecido por “jaca”, chega a ter de 12 a 90 cm de comprimento, 13 a 50 cm de diâmetro e apresenta peso variando de 3 a 60 kg, sendo considerado um dos maiores frutos do mundo (GOMES, 2007). É um fruto composto, do tipo sincarpo de forma ovalada ou arredondada que nasce diretamente no tronco e nos galhos mais grossos, apresentando pedúnculo grosso e cilíndrico, que tem na inserção do fruto um disco bem desenvolvido que é característico da espécie (CAVALCANTE, 1996).

A parte comestível da jaca são os frutículos encontrados no interior dos sincarpas, em grande número, ultrapassando geralmente a centena. Estes são os ovários das flores, desenvolvidos, constituindo os “bagos” de cor amarelada, sabor doce, cheiro forte e característico, reconhecível a longa distância. Os bagos podem ser de consistência um pouco endurecida ou totalmente mole, derivando daí a distinção de duas variedades muito conhecidas e denominadas popularmente de “jaca-mole” e “jaca-dura” (OLIVEIRA, 2006).



Fonte: www.google.com.br (acesso em 28/09/2013).

Figura 4. Jaqueira (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) com vários frutos em diferentes estágios de frutificação.

É uma planta produtora de látex, como as diversas espécies de plantas pertencentes às famílias Apocynaceae, Caricaceae e Euphorbiaceae (TEIXEIRA et al., 2008; TOMAR et al., 2008). Todas as partes da planta possuem látex de cor branca e com característica pegajosa, que é produzido por células secretoras especiais, chamadas laticíferas (MEKKRIENGKRAI et al., 2004). O látex é uma emulsão aquosa composta por várias substâncias, como lipídios, resinas, açúcares e proteínas, incluindo enzimas proteolíticas (FONSECA et al., 2010).

O látex coletado da jaqueira é citado na literatura como um composto bioativo, efetivo no tratamento de asma, vermífugo, cicatrizante de rachadura nos pés (GUPTA; TANDON, 2004) e promotor de cicatrização em abscessos, edemas ofídicos e glandulares quando misturado a vinagre (BALIGA et al., 2011).

A fração proteásica obtida do látex também é citada como funcional. Em estudo realizado por Chanda et al. (2009), essa fração, quando coletada do

pendúculo do fruto, apresentou efeito anti-inflamatório; Siritapetawee et al. (2012a) purificaram protease com atividade antimicrobiana contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e isolado clínico de *Candida albicans*. Em trabalho posterior, Siritapetawee et al. (2012b) também confirmaram atividade fibrinolítica da mesma protease.

2.8 Proteases

Proteases, peptidases ou enzimas proteolíticas são denominações referentes às enzimas capazes de hidrolisar ligações peptídicas (ANTÃO; MALCATA, 2005). Podem atuar perto das extremidades das cadeias polipeptídicas, sendo denominadas neste caso de exopeptidases; e as endopeptidases atuando no interior das cadeias (PALMA et al., 2002).

Exopeptidases tem sido classificadas em aminopeptidases, que são capazes de clivar peptídeos do N-terminal, e carboxipeptidases que degradam peptídeos na extremidade C-terminal. As endopeptidases são classificadas de acordo com o seu mecanismo catalítico, o que implica na especificidade do sítio ativo da enzima (GONZÁLEZ-RÁBADE et al., 2011).

Outras formas de classificação das endopeptidases foram propostas, como o Banco de Dados MEROPS, que considera sete famílias de proteases: aspártico, cisteína, glutâmico, metalo, asparagina, serina e treonina (RAWLINGS et al., 2010).

São consideradas enzimas importantes, já que desempenham papel significativo em vários mecanismos bioquímicos no processo de manutenção de todos os organismos. São amplamente utilizadas em indústrias farmacêuticas, têxteis, couro, detergentes e alimentícias (SIRITAPETAWEET et al., 2012). No mercado mundial de enzimas ocupam o primeiro lugar, com valor de comércio estimado em três bilhões de dólares (LEARY et al., 2009).

Desempenham um importante papel na área da biotecnologia, dado que a proteólise gerada pela enzima altera as propriedades químicas, físicas, biológicas e imunológicas das proteínas. A hidrólise das proteínas alimentares, por exemplo, é realizada para melhoria das características nutricionais, retardamento da deterioração, modificação de diferentes propriedades funcionais (solubilidade,

formação de espuma, coagulação e capacidades emulsificantes), prevenção de interações indesejáveis, mudança de sabores e odores e remoção de fatores tóxicos ou inibitórios (PARDO et al., 2000).

Várias técnicas de processamento de alimentos podem ser obtidas com a hidrólise de proteínas através de proteases específicas. Entre os efeitos positivos que se esperam com tal utilização, há aqueles aspectos relacionados com o valor nutricional e atividade funcional dos alimentos. Estes incluem a melhoria da digestibilidade, modificações da qualidade sensorial, como a textura ou sabor, e benefícios para a saúde, como a melhoria da capacidade antioxidante ou redução de compostos alergênicos (VAN BOEKEL et al., 2010).

A maioria das enzimas comerciais é obtida principalmente a partir de fontes microbianas, contudo enzimas de plantas estão se tornando cada vez mais importantes, com aplicações na biotecnologia, farmacologia e na indústria de alimentos (GONZÁLEZ-RÁBADE et al., 2011).

2.9 Proteases vegetais

Como em outros organismos, plantas também utilizam proteases para degradar proteínas em aminoácidos. Além disso, as proteases presentes em plantas são também reguladoras-chave de diversos processos em resposta ao desenvolvimento da planta e de estímulos ambientais (VAN DER HOORN, 2008).

Em demais organismos, as proteases estão envolvidas em vários processos a nível celular e tecidual, que vão desde o início do crescimento e desenvolvimento até o fim destes processos (KATO; SAKAMOTO, 2010; COLL et al., 2011). Particularmente em plantas, proteases se mostram envolvidas na formação do xilema, na maturação da semente, na mobilização de nutrientes armazenados, na renovação de proteínas danificadas, na senescência, entre outros (TSIATSIANI; GEVAERT; BREUSEGEM, 2011).

Plantas produzem mais de 600 diferentes proteases, entretanto somente cerca de 40 tipos tem sua função biológica conhecida (KOHLI et al., 2012). São descritas cinco classes de endopeptidases que ocorrem em plantas: serino, cisteína, aspártico, metalo e treonina protease (RAWLINGS et al., 2010).

A maioria das proteases derivadas de plantas foi classificada como cisteína protease e, mais raramente, como proteases aspárticas (RAWLINGS et al., 2010). Várias proteases tem sido identificadas e estudadas a partir do látex de diversas famílias de plantas, como Asteraceae, Caricaceae, Moraceae, Asclepiadaceae, Apocynaceae e Euphorbiaceae (DOMSALLA; MELZIG, 2008).

Quanto às suas aplicações, proteases vegetais tem sido utilizadas e relatadas na literatura para a obtenção de peptídeos bioativos. Memarpoor-Yazdi, Assodeh e Chamani (2012) realizaram hidrólise da lisozima do ovo da galinha através da utilização de papaína, tripsina e da combinação das duas enzimas para obtenção de peptídeos antioxidantes; Boschini et al. (2014) utilizaram pepsina para hidrólise de proteínas de leguminosas, a fim de obtenção de peptídeos com atividade inibitória da enzima conversora de angiotensina (ECA).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antimicrobiana e antioxidante de peptídeos obtidos através da hidrólise de caseínas bovinas por proteases do látex da jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.).

3.2 Objetivos específicos

- Obter as proteases do látex da jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.);
- Analisar através de zimograma o perfil das proteases obtidas do látex da jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.);
- Hidrolisar as caseínas do leite bovino para obtenção dos peptídeos antimicrobianos e antioxidantes;
- Avaliar o hidrolisado e peptídeos obtidos quanto às atividades antimicrobiana, antioxidante e quelante de Cu^{2+} ;
- Identificar o perfil dos peptídeos antimicrobianos, antioxidantes e quelantes de Cu^{2+} por cromatografia de fase reversa (RP- HPLC).

4. REFERÊNCIAS

- ALVAREZ, E. M.; RISSO, P. H.; GATTI, C. A.; BURGOS, M.; SUAREZ-SALA, V. Calcium-induced aggregation of bovine caseins: effect of phosphate and citrate. *Colloid and Polymer Science*, v. 285, p. 507-514, 2007.
- ANTÃO, C. M.; MALCATA, F. X. Plant serine proteases: biochemical, physiological and molecular feature. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 43, p. 637–650, 2005.
- ANUÁRIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA 2010. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2010. 128 p.
- BALIGA, M. S., SHIVASHANKARA, A. R., HANIADKA, R. et al. Phytochemistry, nutritional and pharmacological properties of *Artocarpus heterophyllus* Lam. (jackfruit): A review. *Food Research International*, v. 44, p. 1800-1811, 2011.
- BALQIS, Z. S.; ROSMA, A. *Artocarpus integer* leaf protease: Purification and characterization. *Food Chemistry*, v. 129, p. 1523-1529, 2011.
- BELICIU, C. M.; MORARU, C. I. Effect of solvent and temperature on the size distribution of casein micelles measured by dynamic light scattering. *Journal of Dairy Science*, v. 92, p. 1829-1839, 2009.
- BELICIU, C. M.; MORARU, C. I. Physico-chemical changes in heat treated micellar casein e Soy protein mixtures. *Food Science and Technology*, v. 54, p. 469-476, 2013.
- BOSCHIN, G.; SCIGLIUOLO, G. M.; RESTA, D.; ARNOLDI, A. ACE-inhibitory activity of enzymatic protein hydrolysates from lupin and other legumes. *Food Chemistry*, v. 145, p. 34-40, 2014.
- BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*, v. 3, p. 238-250, 2005.
- BROWN, K. L.; HANCOCK, R. E. Cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Current Opinion in Immunology*, v. 18, p. 24-36, 2006.
- CAVALCANTE, P. B. Frutas comestíveis da Amazônia. 6 ed. Belém: CNPq/Museu Paraense Emílio Goeldi, 1996. 276 p.
- CHANG, O. K.; SEOL, K. H.; JEONG, S. G.; OH, M. H.; PARK, B. Y.; PERRIN, C.; HAM, J. S. Casein hydrolysis by *Bifidobacterium longum* KACC91563 and antioxidant activities of peptides derived therefrom. *Journal of Dairy Science*, v. 96, p. 5544-5555, 2013.
- CHATTERTON, D. E. W.; SMITHERS, G.; ROUPAS, P.; BRODKORB, A. Bioactivity of β -lactoglobulin and α -lactalbumin - Technological implications for processing. *International Dairy Journal*, v. 16, p. 1229-1240, 2006.
- COLL, N. S.; EPPLE, P.; DANGL, J. L. Programmed cell death in the plant immune system. *Cell Death & Differentiation*, v. 18, p. 1247–1256, 2011.
- CORRÊA, A. P. F. Obtenção de peptídeos bioativos a partir da hidrólise enzimática de caseinato ovino e soro de queijo ovino. Tese de Doutorado em Microbiologia

Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2013, p. 20.

DALGLEISH, D. G.; SPAGNUOLO, P.; GOFF, H. D. A possible structure of the casein micelle based on high-resolution field-emission scanning electron microscopy. *International Dairy Journal*, v. 14, p. 1025-1031, 2004.

DICKINSON, E. Caseins in emulsions: interfacial properties and interactions. *International Dairy Journal*, v. 9, p. 305-312, 1999.

DOMSALLA, A.; MELZIG, M. F. Occurrence and properties of proteases in plant lattices. *Planta Medica*, v. 74, p. 699–711, 2008.

ENRIGHT, M. C.; ROBINSON, D. A.; RANDLE, G.; FEIL, E. J.; GRUNDMANN, H.; SPRATT, B. G. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 99, p. 7687-7692, 2002.

FONSECA, K. C.; MORAIS, N. C.; QUEIROZ, M. R.; SILVA, M. C.; GOMES, M. S.; COSTA, J. O.; MAMEDE, C. C.; TORRES, F. S.; PENHA-SILVA, N.; BELETTI M. E.; CANABRAVA, H. A.; OLIVEIRA, F. Purification and biochemical characterization of Eumiliin from *Euphorbia milii* var. *hislopii* latex. *Phytochemistry*, v. 71, p. 708-715, 2010.

FOX, P. F.; BRODKORB, A. The casein micelle: Historical aspects, current concepts and significance. *International Dairy Journal*, v. 18, p. 677–684, 2008.

GHOSH, A.; ALI, M. A.; DIAS, G. J. Effect of cross-linking on microstructure and physical performance of casein protein. *Biomacromolecules*, v. 10, p. 1681-1688, 2009.

GOBBETTI, M.; MINERVINI, F.; RIZZELLO, C.G. Bioactive peptides in dairy products. In: Y. H. Hui. *Handbook of Food Products Manufacturing*. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 2007. p. 489–517.

GOMES, E. R. S. Espécies exóticas invasoras em Unidades de Conservação da Cidade do Rio de Janeiro, RJ – Estudo da população de jaqueiras (*Artocarpus heterophyllus* L.) no Parque Natural Municipal do Mendanha, RJ. Dissertação de Mestrado em Ciências Ambientais e Florestais – Instituto de Florestas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2007. p. 83.

GONZÁLEZ-RÁBADE, N.; BADILLO-CORONA, J. A.; ARANDAS-BARRADAS, J. S.; OLIVER-SALVADOR, M. D. C. Production of plant proteases *in vivo* and *in vitro* – A review. *Biotechnology Advances*, v. 29, p. 983-996, 2011.

GUPTA, A. K.; TANDON, N. Review on Indian Medicinal Plants. New Delhi: Indian Council of Medical Research, 2004.

HARTMANN, R.; MEISEL, H. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 18, p. 163-169, 2007.

HE, R.; JU, X.; YUAN, J.; LIFENG WANG, L.; GIRGIH, A. T.; ALUKO, R. E. Antioxidant activities of rapeseed peptides produced by solid state fermentation. *Food Research International*, v. 49, p. 432-438, 2012.

HIRSH, E. B.; TAM, V. H. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumonia* carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 65, p. 1119-1125, 2010.

INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS (IBRAF). Em primeira edição, FRUIT & LOG atrai empresas do setor para reserva de estandes. Disponível em: <http://www.ibraf.org.br/imprensa/0906_EmPrimeiraEdicao.asp>. Acesso em: 10 de setembro, 2013.

JAGTAP, U. B.; V.A. BAPAT, V. A. *Artocarpus*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 129, p. 142-166, 2010.

JARRET, F. M. Studies in *Artocarpus* and allied genera. III. A revision of *Artocarpus* subgenus *Artocarpus*. *Journal of Arnold Arboretum*, v. 40, p. 1–298, 1959.

JOST, R. Milk and Dairy Products. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, v. 23, p. 315-375, 2012.

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

KAMYSZ, W.; TURECKA, K. Antimicrobial preservative effectiveness of natural peptide antibiotics. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, v. 62, p. 341-344, 2005.

KATO, Y.; SAKAMOTO, W. New insights into the types and function of proteases in plastids. *International Review of Cell and Molecular Biology*, v. 280, p. 185–218, 2010.

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

KOHLI, A.; NARCISO, J. O.; MIRO, B.; RAORANE, M. Root proteases: reinforced links between nitrogen uptake and mobilization and drought tolerance. *Physiologia Plantarum*, v. 145, p. 165-179, 2012.

KORHONEN, H. J. Bioactive Components in Bovine Milk. In: Park, Y. W. *Bioactive Components in Milk and Dairy Products*. Iowa: Wiley-Blackwell, 2009a, p. 15-42.

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

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

KORHONEN, H.; PIHLANTO-LEPPÄLÄ, A. Milk-derived bioactive peptides: Formation and prospects for health promotion. In: C. Shortt and J. O'Brien. *Handbook of Functional Dairy Products*. Boca Raton: CRC Press, 2004, p. 109 – 124.

LEARY, D.; VIERROS, M.; HAMON, G.; ARICO, S.; MONAGLE, C. Marine genetic resources: a review of scientific and commercial interest. *Marine Policy*, v. 33, p. 183–194, 2009.

- LÖNNERDAL, B. Bioactive proteins in human milk: mechanisms of action. *Journal of Pediatrics*, v. 156, p. 26–30, 2010.
- LORENZI, H.; BACHER, L.; LACERDA, M.; SARTORI, S. Frutas brasileiras e exóticas cultivadas: de consumo in natura. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, 2006. p. 672.
- MARTÍNEZ-MARQUEDA, D.; MIRALLES, B.; CRUZ-HUERTA, E.; RECIO, I. Casein hydrolysate and derived peptides stimulate mucin secretion and gene expression in human intestinal cells. *International Journal Dairy*, v. 32, p. 13-19, 2013.
- MCCARTHY, N. A.; KELLY, A. L.; O'MAHONY, J. A; FENELON, M. A. Sensitivity of emulsions stabilised by bovine b-casein and lactoferrin to heat and CaCl₂. *Food Hydrocolloids*, v. 35, p. 420-428, 2014.
- MCMAHON, D. J.; OOMMEN, B. S. Supramolecular structure of the casein micelle. *Journal of Dairy Science*, v. 91, p. 1709-1721, 2008.
- MEISEL, H. Bioactive substances of food origin: a challenge for food and nutrition science. *Nahrung Weinheim*, v. 43, n. 3, p. 147, 1999.
- MEKKRIENGKRAI, D.; UTE, K.; SWIEZEWSKA, E.; CHOJNACKI, T.; TANAKA, Y.; SAKDAPIPANICH, J. T. Structural characterization of rubber from jackfruit and euphorbia as a model of natural rubber. *Biomacromolecules*, v. 5, p. 1013-1019, 2004.
- MEMARPOOR-YAZDI, M.; ASSODEH, A.; CHAMANI, J. A novel antioxidant and antimicrobial peptide from hen egg white lysozyme hydrolysates. *Journal of Functional Foods*, n.4, p. 278–286, 2012.
- MICHAELIDOU, A. M. Factors influencing nutritional and health profile of milk and milk products. *Small Ruminant Research*, v. 79, p. 42-50, 2008.
- NASCIMENTO, A. C. C.; FONTES, W.; SEBBEN, A.; CASTRO, M. S.; Antimicrobial peptides from anurans skin secretions. *Protein and Peptides Letters*, v. 10, p. 227-238, 2003.
- OLALLA, M.; RUIZ-LÓPEZ, M. D.; NAVARRO, M.; ARTACHO, R.; CABRERA, C.; GIMÉNEZ, R.; RODRIGUEZ, C.; MINGORANCE, R. Nitrogen fractions of Andalusian goat milk compared to similar types of commercial milk. *Food Chemistry*, v. 113, p.835-838, 2009.
- OLIVEIRA, L. P. Seleção e aproveitamento biotecnológico de frutos encontrados na Amazônia para elaboração de bebida alcoólica fermentada utilizando levedura imobilizada. Tese de Doutorado em Biotecnologia – Universidade Federal do Amazonas/PPGCIFA, 2006. p. 177.
- PALMA, J. M.; SANDALIO, L. M.; CORPAS, F.J.; ROMERO-PUERTAS, M. C.; MCCARTHY, I.; DEL RIO, L. A. Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 40, p. 521–30, 2002.
- PALUMBO, D.; IANNACCONE, M.; PORTA, A.; CAPPARELLI, R. Experimental antibacterial therapy with puriindolines, lactoferrin and lysozyme in *Listeria monocytogenes*-infected mice. *Microbes and Infection*, v. 12, p. 538-545, 2010.

- PARDO, M. F.; LOPEZ, M. I.; CANALS, F.; ZVILES, F. X.; NATALUCCI, C. L., CAFFINI, N. O. Purification of balansain I, an endopeptidase from unripe fruits of *Bromelia balansae* Mez (Bromeliaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 48, p. 3795–3800, 2000.
- PARK, S. C.; PARK, Y.; HAHM, K. S. The role of antimicrobial peptides in preventing multidrug-resistant bacterial infections and biofilm formation. *International of Molecular Sciences*, v. 12, p. 5971-5992, 2011.
- PARK, Y. W. Overview of Bioactive Components in Milk and Dairy Products. In: Park, Y. W. *Bioactive Components in Milk and Dairy Products*. Iowa: Wiley-Blackwell, 2009, p. 3-12.
- PELLEGRINI, A. Antimicrobial peptides from food proteins. *Current Pharmaceutical Design*, v. 9, p. 1225 – 1238, 2003.
- PERJES, A.; KUBIN, A. M.; KONYI, A.; SZABADOS, S.; CZIRAKI, A.; SKOUMAL, R.; et al. (2012). Physiological regulation of cardiac contractility by endogenous reactive oxygen species. *Acta Physiologica*, v. 205, p. 26–40, 2012.
- PETERS, B. M.; SHIRTLIFF, M. E.; JABRA-RIZK, M. A. Antimicrobial peptides: primeval molecules or future drugs? *PLoS Pathogens*, v. 6, p. 1-4, 2010.
- PHELAN, M.; AHERNE, A.; FITZGERALD, R. J.; O'BRIEN, N. M. Casein-derived bioactive peptides: Biological effects, industrial uses, safety aspects and regulatory status. *International Dairy Journal*, v. 19, p. 643-654, 2009.
- PIHLANTO, A.; VIRTANEN, T.; KORHONEN, H. Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity and antihypertensive effect of fermented milk. *International Dairy Journal*, v. 20, p. 3–10, 2010.
- PIHLANTO-LEPPÄLÄ, A. Isolation and characterisation of milk-derived bioactive peptides. University of Turku, Turku, Finland. 1999.
- QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbanepemases: the versatile elactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 20, p. 440-458, 2007.
- RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J.; BATEMAN, A. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Research*, v. 38, p. 227–233, 2010.
- RONCADA, P.; PIRAS, C.; SOGGIU, A.; TURK, R.; URBANI, A.; BONIZZIC, L. Farm animal milk proteomics. *Journal of Proteomics*, v. 75, p. 4259-4274, 2012.
- RUIS, H. G. M.; VENEMA, P.; LINDEN, E. Relation between pH-induced stickiness and gelation behavior of sodium caseinate aggregates as determined by light scattering and rheology. *Food Hydrocolloids*, v. 21, p. 545-554, 2007.
- SARMADI, B. H.; ISMAIL, A. Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides*, v. 31, p. 1949–1956, 2010.
- SGARBIERI, C. V. Review: Structural and physicochemical properties of milk proteins. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 8, p. 43-56, 2005.
- SILVA, A. V.; MALCATA, F. X. Caseins as source of bioactive peptides. *International Dairy Journal*, v. 15, p. 1-15, 2005.

- SIRITAPETAWE, J.; THAMMASIRIRAK, S.; SAMOSORNSUK, W. Antimicrobial activity of a 48-kDa protease (AMP48) from *Artocarpus heterophyllus* latex. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, v. 16 p. 132–137, 2012a.
- SIRITAPETAWE, J.; THUMANU, K.; SOJIKUL, P.; THAMMASIRIRAK, S. A novel serine protease with human fibrino(geno)lytic activities from *Artocarpus heterophyllus* latex. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1824, p. 907-912, 2012b.
- TEIXEIRA, R. D.; RIBEIRO, H. A.; GOMES, M. T.; LOPES, M. T.; SALAS, C. E. The proteolytic activities in latex from *Carica candamarcensis*, *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 46, p. 956–961, 2008.
- TOMAR, R.; KUMAR, R.; JAGANNADHAM, M. V. A stable serine protease, wrightin, from the latex of the plant *Wrightia tinctoria* (Roxb.) R. Br.: purification and biochemical properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, p. 1479–1487, 2008.
- TSIATSIANI, L.; GEVAERT, K.; BREUSEGEM, F. V. Natural substrates of plant proteases: how can protease degradomics extend our knowledge? *Physiologia Plantarum*, v. 145, p. 28-40, 2011.
- TUINIER, R.; KRUIF, C. G. Stability of casein micelles in milk. *Journal of Chemical Physics*, v. 117, 1290-1295, 2002.
- VAN BOEKEL, M.; FOGLIANO, V.; PELLEGRINI, N.; STANTON, C.; SCHOLZ, G.; S. LALLJIE, S.; SOMOZA, V.; KNORR, D.; RAO, P.; EISENBRAND, J. G. A review on the beneficial aspects of food processing. *Molecular Nutrition and Food Research*, v. 54, p. 1215–1247, 2010.
- VAN DER HOORN, R. A. L. Plant proteases: from phenotypes to molecular mechanisms. *Annual Review of Plant Biology*, v. 59, p. 191–223, 2008.
- WU, S.; QI, W.; LI, T.; LU, D.; SU, R.; HE, Z. Simultaneous production of multi-functional peptides by pancreatic hydrolysis of bovine casein in an enzymatic membrane reactor via combinational chromatography. *Food Chemistry*, v. 141, p. 2944-2951, 2013.
- XIE, N.; WANG, C.; AO, J.; LI, B. Non-gastrointestinal-hydrolysis enhances bioavailability and antioxidant efficacy of casein as compared with its in vitro gastrointestinal digest. *Food Research International*, v. 51, p. 114-122, 2013.
- XUE, Z.; YU, W.; LIU, Z.; WU, M.; KOU, X.; WANG, J. Preparation and antioxidative properties of a rapeseed (*Brassica napus*) protein hydrolysate and three peptide fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 57, p. 5287–5293, 2009.
- YAMADA, A.; SAKURAI, T.; OCHI, D.; MITSUYAMA, E.; YAMAUCHI, K.; ABE, F. Novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from bovine casein. *Food Chemistry*, v. 141, p. 3781-3789, 2013.

CAPÍTULO I

Produção de peptídeos antimicrobianos e antioxidantes a partir da hidrólise de caseínas do leite bovino por proteases do látex da jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.)

A ser submetido à revista:

Journal of Dairy Science



Produção de peptídeos antimicrobianos e antioxidantes a partir da hidrólise de caseínas do leite bovino por proteases do látex da jaca (*Artorcapus heterophyllus* Lam.)

Alana Emilia Soares de França Queiroz*, José Erick Galindo Gomes*, Anna Carolina da Silva*, Mariana de Souza Arruda †, Amanda Reges de Sena ‡, Talita Camila Evaristo da Silva Nascimento*, Renato José Reis Molica*, Keila Aparecida Moreira^{*1}

* Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Avenida Bom Pastor, s/n, Mundaú, CEP: 55292-270, Garanhuns-PE, Brasil.

† Universidade Federal de Pernambuco. Avenida Prof. Moraes Rego, 123, Cidade Universitária, CEP: 50670-901, Recife-PE, Brasil.

‡ Campus Barreiros, Instituto Federal de Pernambuco. Fazenda Sape, s/n, Sape, CEP: 55560-000, Barreiros-PE, Brasil.

¹Autor correspondente: moreirakeila@hotmail.com

SUMÁRIO INTERPRETATIVO

Caseína é o principal componente proteico do leite bovino. Apresenta além da conhecida composição de aminoácidos, outros compostos de importância para indústrias alimentícia e farmacêutica, como pequenos fragmentos proteicos funcionais, denominados de peptídeos bioativos. Para tanto, é necessária a liberação desses, presentes na proteína original geralmente inativos. Essa liberação é realizada através de hidrólise intermediada por proteases, enzimas que degradam proteínas a peptídeos. O trabalho objetivou a produção de peptídeos antimicrobianos e antioxidantes a partir da hidrólise de caseínas do leite bovino por proteases do látex da jaca (*Artorcapus heterophyllus* Lam.).

RESUMO

Através da hidrólise de caseínas bovinas uma gama de peptídeos com atividade biológica é liberada, como peptídeos antimicrobianos e antioxidantes. Caseínas obtidas do leite bovino foram hidrolisadas com proteases do látex de jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.). Um planejamento fatorial 2^3 foi realizado, com o objetivo de avaliar os efeitos das variáveis relação enzima:substrato (1:50, 1:100 e 1:150), temperatura (28, 34 e 40 °C) e tempo de hidrólise (8, 16 e 24 horas). O ensaio formado pela relação enzima:substrato 1:50, temperatura de 40 °C e hidrólise durante 24 h apresentou maior grau de hidrólise ($37,84 \pm 1,68\%$), com dados confirmados através do perfil eletroforético Tricina-SDS-PAGE. A amostra deste ensaio foi selecionada para ser avaliada em relação às atividades antimicrobiana, testado frente à *Staphylococcus aureus* UFPEDA 02, *Enterococcus faecalis* UFPEDA, *Bacillus subtilis* UFPEDA 86, *Escherichia coli* UFPEDA 224, *Klebsiella pneumoniae* UFPEDA 396 e *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 416; antioxidante, através da metodologia de eliminação do radical ABTS⁺ e quelante de Cu^{2+} , através de mensuração com violeta de pirocatecol. A mesma amostra foi fracionada via cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC), com obtenção de 16 frações (FH1-FH16), também analisadas em relação às atividades biológicas. Todas as frações a 1 mg/mL apresentaram atividade antimicrobiana contra pelo menos um micro-organismo, com as frações FH1, FH7, FH10, FH11 e FH13 apresentando atividade contra todos os micro-organismos testados. As frações obtidas também apresentaram atividade antioxidante a 1 mg/mL, com a fração FH9 apresentando a maior atividade ($94,94 \pm 0,60\%$ e $954,43 \pm 6,12 \mu\text{M}$ de atividade antioxidante e atividade equivalente ao Trolox); e 4 frações (FH2, FH9, FH12 e FH13) apresentaram atividade quelante de Cu^{2+} , com valores de $4,07 \pm 1,76$ a $15,71 \pm 2,05\%$. Os peptídeos gerados a partir da hidrólise de caseínas bovinas por proteases do látex da jaca mostram-se multifuncionais, apresentando mais de uma atividade biológica, com possíveis aplicações na formulação de alimentos funcionais e no desenvolvimento de fármacos.

Palavras-chave: atividade antimicrobiana; ABTS; caseína bovina; *Artocarpus heterophyllus* Lam.

INTRODUÇÃO

A jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) é uma árvore pertencente à família Moraceae e é amplamente distribuída em países tropicais como o Brasil (Chowdhury et al., 1997). É uma planta produtora de látex, uma emulsão aquosa composta por várias substâncias, como lipídios, resinas, açúcares e proteínas, incluindo enzimas proteolíticas (Fonseca et al., 2010).

Proteases ou enzimas proteolíticas são consideradas uma ferramenta importante para a obtenção de hidrolisados proteicos que necessitem de peptídeos específicos em bom estado de preservação (Tavano, 2013). Basicamente, a rota mais comum para a produção de peptídeos que apresentem atividade biológica é através da hidrólise de proteínas por processos digestivos ou por fermentação microbiana, mas processos enzimáticos *in vitro* são amplamente estudados (Agyei; Danquar, 2011; Hernández-Ledesma et al., 2011) e a utilização de enzimas proteolíticas derivadas de plantas tem sido empregadas com sucesso na produção dessas moléculas (Phelan et al., 2009).

Peptídeos com atividade biológica, também chamados de peptídeos bioativos, são definidos como fragmentos específicos de proteínas que apresentam impacto positivo sobre funções fisiológicas, podendo influenciar a saúde (Kitts; Weiler, 2003). As proteínas do leite são consideradas a mais importante fonte de peptídeos bioativos (Korhonen, 2009).

Em sua composição, o leite apresenta 3,5% de conteúdo proteico, sendo constituído por proteínas do soro (20%) e caseínas (80%), essas últimas classificadas em α -, β - e κ -caseínas (Jauhiainen; Korpela, 2007). As caseínas são os principais componentes proteicos do leite e não são apenas proteínas de alta qualidade, devido principalmente às suas exclusivas composições de aminoácidos, mas também é uma excelente fonte de peptídeos bioativos, que desempenham papéis importantes nos sistemas cardiovascular, digestivo, imune e nervoso (Silva; Macata, 2005). A partir da hidrólise de caseínas uma gama de peptídeos com atividade biológica é liberada, como peptídeos antimicrobianos (McCann et al., 2006; Benkerroum, 2010) e antioxidantes (Pihlanto, 2006; Chen et al., 2012; Su et al., 2012).

O objetivo deste estudo foi produzir peptídeos antimicrobianos e antioxidantes a partir da hidrólise de caseínas do leite bovino por protease do látex da jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.).

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

O extrato enzimático da jaca, contendo proteases, foi obtido do látex do pedúnculo do fruto da Jaqueira (*Artocarpus heterophyllus* Lam.), localizada na cidade de Garanhuns, Pernambuco, Brasil. Reagentes químicos incluindo azocaseína, 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (**ABTS**), 2,4,6-ácido trinitrobenzeno sulfônico (**TNBS**), ácido trifluoroacético (**TFA**), *Coomassie Brilliant Blue* R-250 e *Comassie Blue* G-250 foram adquiridos da Sigma Co. (St Louis, Missouri, Estados Unidos). Acetonitrila grau HPLC, da Merck (Darmstadt, Alemanha) e unidade ultrapurificadora de água (ELGA Ltd., Bucks, Inglaterra). Todos os outros reagentes e solventes foram de grau analítico e obtidos de fontes comerciais.

Obtenção do extrato enzimático da jaca

O látex obtido do pedúnculo da jaca foi diluído em tampão fosfato 0,1 M, pH 7, na proporção de 1 g de látex para 100 mL de tampão. A solução resultante foi agitada durante 1 hora em agitador magnético à temperatura ambiente, para acelerar a solubilização, e logo depois foi filtrada com papel de filtro e congelada a – 20 °C para uso posterior, de acordo com metodologia utilizada por Silva et al. (2013).

Eletroforese do extrato enzimático da jaca

Para determinar o perfil eletroforético do extrato enzimático da jaca, foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante com dodecil sulfato de sódio (**SDS-PAGE**), de acordo com Laemmli (1970), utilizando gel de concentração e separação de 4 e 15%, respectivamente. Volume de 10 µL (com 100 µg/mL de

proteína do extrato da jaca) foi carregada nos poços. A corrida das amostras transcorreu a 4 °C, 179 V, 25 mA e 4 W. Como padrões foram utilizadas fosforilase B (97 kDa), albumina (66 kDa), ovalbumina carbônica (45 kDa), anidrase (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactalbumina (14,4 kDa), do Kit de Calibração de Baixo Peso Molecular (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido). Depois da migração, o gel foi corado durante 120 minutos em solução a 45% (v/v) de metanol e 10% de ácido acético contendo 0,25% (p/v) de *Coomassie Brilliant Blue* R-250. A descoloração foi realizada durante 24 horas em solução de 45% (v/v) de metanol e 10% (v/v) de ácido acético. Para melhor detecção das bandas, foi utilizado kit de coloração de prata PlusOne (GE Healthcare, Uppsala, Suécia).

Zimograma do extrato enzimático da jaca

Para detecção da atividade proteolítica do extrato enzimático da jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) foi realizado zimograma, de acordo com metodologia de Egito et al. (2007) com modificações. Volume de 10 μ L (com 0,5 mg do extrato liofilizado da jaca) foi adicionado ao poço do gel, este com adição de 0,1% de gelatina. Os géis de concentração e separação foram compostos por 4% e 13,4% (p/v) de acrilamida, respectivamente. A corrida transcorreu a 4 °C, por 100 minutos a 200 V, 24,9 mA, 5 W. Após migração, o gel foi incubado em solução reveladora, composta por 40% (v/v) de etanol, 10% (v/v) de ácido acético e 0,1% (p/v) de *Comassie Blue* R-250 por 60 minutos; e descorado por várias lavagens com solução descorante composta por 30% (p/v) de etanol + 7,5% (v/v) de ácido acético. As proteases ativas foram reveladas através de bandas translúcidas no gel.

Obtenção da caseína bovina

Para obtenção da caseína a partir do leite bovino foi utilizado leite de uma vaca holandesa pertencente a um rebanho na cidade de Pesqueira, Brasil. Seguiu-se metodologia segundo Egito et al. (2006), em que o leite foi desnatado por centrifugação a 2100 x g por 30 minutos a 32 °C e logo depois precipitado em pH 4,6 com HCl 1 M. O precipitado (caseína) foi lavado com água destilada e solubilizado à

pH 7,0 com NaOH 1 M. O ciclo precipitação-solubilização foi repetido mais duas vezes até finalmente a caseína ser solubilizada pela última vez e ser dialisada contra água deionizada a 4 °C e, posteriormente, liofilizada (LD 1500D, Terroni Equipamentos Científicos Ltda., Brasil).

Hidrólise da caseína bovina pelo extrato enzimático da jaca

A caseína bovina liofilizada foi dissolvida em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,5 a 1% (p/v) e incubada com o extrato enzimático da jaca em diferentes condições de hidrólise, obtidas através de planejamento fatorial completo ²³, utilizado para estudar os efeitos e interações das variáveis relação enzima:substrato (1:50, 1:100 e 1:150), temperatura (28, 34 e 40 °C) e tempo de hidrólise (8, 16 e 24 horas) sob o grau de hidrólise (%), de acordo com a Tabela 1. Neste planejamento, um conjunto de 11 ensaios foram realizados, denominados de H1-H11, para melhor compreensão dos resultados. A reação da hidrólise foi interrompida por aquecimento a 100 °C por 10 minutos. Os hidrolisados foram armazenados a - 20 °C até o uso para determinação das atividades antimicrobiana e antioxidante e para realização da eletroforese Tricina-SDS-PAGE e cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (**RP-HPLC**), conforme metodologia de Egito et al. (2006).

Determinação do grau de hidrólise

O grau de hidrólise obtido foi considerado como o percentual de ligações peptídicas clivadas, foi determinado por meio da medição de grupos amino livres com 2,4,6-ácido trinitrobenzeno sulfônico (**TNBS**), de acordo com metodologia descrita por Adler-Nissen (1979). O grau de hidrólise foi expresso em porcentagem (%), seguindo a equação $GH(\%) = 100[(AN_2 - AN_1)/N_{pb}]$, onde AN_1 é o conteúdo de nitrogênio do substrato proteico antes da hidrólise, AN_2 é o conteúdo de nitrogênio do substrato depois da hidrólise e N_{pb} é o conteúdo de ligações peptídicas no substrato proteico, os dois primeiros determinados pelo método do TNBS e o último determinado pelo método de micro-Kjeldahl (AOAC, 2000).

Tricina-SDS-PAGE da caseína bovina hidrolisada

Para visualização dos produtos gerados pela hidrólise da caseína pelo extrato enzimático da jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) foi realizada eletroforese em gel desnaturante Tricina-SDS-PAGE, de acordo com metodologia de Schagger e von Jagow (1987). Quantidades de 20 µL de cada hidrolisado obtido foi carregada no gel, constituído por géis de concentração e separação a 4,9 e 15,4%, respectivamente. Para corrida dos géis foi utilizada cuba SE 600 Ruby (Amersham Bioscience, Buckinghamshire, Inglaterra). A corrida transcorreu a 4 °C, por 585 minutos a 184 V, 25 mA e 5 W. Como padrões, foram utilizadas triose-fosfato isomerase (26,625 Da), mioglobulina (16,950 Da), α -lactoalbumina (14,437 Da), aprotina (6,512 Da), insulina β cadeia oxidada (3,496 Da) e bacitracina (1,423 Da), do Kit de Calibração Polipeptídeo (Bio-rad, Hercules, Califórnia). Após migração, o gel foi incubado em solução composta por 50% de água deionizada, 40% de metanol e 10% de ácido acético por 30 minutos e, posteriormente, o gel foi corado por solução de 90% de água deionizada e 10% de ácido acético, contendo 0,25 g de *Comassie Blue* G-250, durante 60 minutos. As bandas foram então detectadas após três lavagens de 15 minutos cada com solução descorante composta por 90% de água deionizada e 10% de ácido acético e coradas com coloração de prata PlusOne (GE Healthcare, Uppsala, Suécia).

Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC) do hidrolisado

Para identificação dos peptídeos obtidos do hidrolisado escolhido através do grau de hidrólise (%) e da Tricina-SDS-PAGE foi utilizada coluna Luna C18 (250 x 4,6mm) 5 µm de tamanho de partícula (Phenomenex, Torrance, Califórnia, Estados Unidos) conectada ao HPLC modelo LC20A, Prominence (Shimadzu, Japão). Uma quantidade de 100 µL da amostra do hidrolisado foi injetada na coluna, eluída através da fase móvel A, constituída por água ultrapura na presença de 0,1% de ácido trifluoroacético; e fase móvel B, constituída por acetonitrila a 100% na presença de 0,1% de ácido trifluoroacético, a separação foi realizada através de

gradiente linear. A absorbância do eluente foi monitorada através de arranjo de fotodiodo SPD-M20A, Prominence (Shimadzu, Japão) a 214 nm e fluxo de 1 mL/min. As frações de peptídeos (pool de peptídeos) foram coletadas, liofilizadas e armazenadas a -20°C até determinação das atividades antimicrobiana e antioxidante.

Atividade antimicrobiana do hidrolisado e das frações dos peptídeos

A atividade antimicrobiana do hidrolisado e frações dos peptídeos foram realizadas seguindo ensaio de microdiluição em caldo, conforme norma M7-A6 do CLSI (CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2003). Placas de 96 poços de fundo plano, de poliestireno e estéreis foram utilizadas (Corning®) para o ensaio. O hidrolisado e as frações dos peptídeos foram testados contra três bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* UFPEDA 02, *Enterococcus faecalis* UFPEDA 138 e *Bacillus subtilis* UFPEDA 86) e três Gram-negativas (*Escherichia coli* UFPEDA 224, *Klebsiella pneumoniae* UFPEDA 396 e *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 416), adquiridas da Coleção de Culturas do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil. Foram testadas concentrações de 0,25 a 10 mg/mL e de 1 mg/mL para o hidrolisado e para as frações de peptídeos, respectivamente. Foram consideradas amostras com atividade antimicrobiana as que obtiveram densidade ótica menor do que a observada no controle positivo de cada bactéria (95% v/v de caldo Mueller-Hinton e 5% v/v de inóculo de cada micro-organismo testado a uma concentração de 10⁶ UFC/mL) através de mensuração a 600 nm em leitora de microplaca Asys UVM 340 (Biochrom, Cambridge, Reino Unido), os ensaios foram realizados em duplicata.

Atividade antioxidante do hidrolisado e das frações dos peptídeos

A atividade sequestradora de radicais livres do hidrolisado, as concentrações de 0,25 a 10 mg/mL; e de 1 mg/mL para as frações de peptídeos, foi determinada usando o radical cátion ABTS^{•+}, gerado a partir de 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (**ABTS**) de acordo com metodologia de Re et al. (1999) com

pequenas modificações. Para formação do radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$, persulfato de potássio e ABTS foram preparados a uma concentração final de 2,45 e 7 mM, respectivamente, e incubado ao abrigo de luz por 16 h a 30 °C. Usando espectrofotômetro Libra S22 (Biochrom®, Áustria), a solução do radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$ foi ajustada para uma absorbância de $0,70 \pm 0,02$ a 734 nm, por diluição com tampão fosfato-salino (**PBS**), 100 mM, pH 7,4. Para a reação, 50 μL do hidrolisado e frações foram misturados com 950 μL da solução do radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$. Os ensaios foram incubados a 30 °C por seis minutos e lidos a 734 nm. Todos os ensaios ocorreram em triplicata. Uma curva padrão foi preparada com várias concentrações de Trolox (1-1000 μM). A atividade antioxidante (%) foi calculada em relação à atividade de eliminação do radical, de acordo com a seguinte equação: $[(A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}})/A_{\text{controle}}] \times 100$, onde A_{controle} representa a absorbância inicial do ABTS; e foi expressa também em atividade antioxidante equivalente ao Trolox (**AAET**) em μM , calculada através da equação gerada a partir da curva padrão.

Atividade quelante de Cu^{2+} do hidrolisado e das frações dos peptídeos

A atividade quelante de Cu^{2+} do hidrolisado e das frações de peptídeos, a concentrações de 0,25 a 10 mg/mL; e de 1 mg/mL, respectivamente, foi determinada com a utilização de violeta de pirocatecol (**VP**), de acordo com metodologia de Saiga et al. (2003), com pequenas modificações. A mistura reacional de 500 μL de tampão acetato 50 mM pH 6,0 e 12,5 μL de CuSO_4 5mM foram adicionados a 125 μL das amostras. Transcorridos 30 minutos de incubação à temperatura ambiente foi adicionado 12,5 μL de violeta de pirocatecol a 4mM. Depois de 30 minutos, a absorbância foi mensurada a 632 nm. Água destilada foi usada como controle. A porcentagem de inibição (%) da formação do complexo VP- Cu^{2+} foi calculada seguindo a seguinte equação: $[(A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}})/A_{\text{controle}}] \times 100$, onde A_{controle} foi a absorbância do controle, e A_{amostra} foi a absorbância das amostras.

Análise estatística

Os resultados obtidos passaram por análise de variância (ANOVA), utilizando o software *Statistica 7.0* (StatSoft Inc., Tulsa, OK, EUA), para verificação das variáveis com efeitos estatisticamente significativos ($p < 0,1$) e para ajuste do modelo aos dados experimentais. A comparação de médias foi realizada pelo teste de Skott-Knott ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$), utilizando o programa SISVAR (Ferreira, 2000). Todos os ensaios foram realizados em ordem aleatória.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Eletroforese e zimograma do extrato enzimático da jaca

O perfil eletroforético em SDS-PAGE do extrato da jaca apresentou 13 bandas visíveis, com presença de uma forte banda entre 97 e 66 kDa, seguida de outras com massas moleculares menores (Figura 1A); quando da análise do zimograma, a única enzima ativa sob as condições zimográficas foi visualizada na mesma localização, sugerindo que essa banda é a protease ativa encontrada no extrato do látex da jaca (Figura 1B). Prasad e Virupaksha (1990) caracterizaram e purificaram protease do látex de *Artocarpus heterophyllus* L., denominando-a de artocarpina. Essa protease possuía massa molecular de 79,5 kDa, ação hidrolítica sob caseína. Siritapetawee et al. (2012) também isolaram e purificaram protease do látex da jaca, denominada AM48, com massa molecular de aproximadamente 48 kDa, atividade caseinolítica e antimicrobiana.

Recentemente proteases vegetais tem chamado atenção de indústrias farmacêuticas e biotecnológicas, devido à apresentação de atividade em uma vasta gama de temperatura e pH, característica ideal para os mais variados tipos de processos (Moro et al., 2013). Possíveis aplicações dessas proteases são amplamente relatadas pela literatura, em indústrias de laticínios, na atividade coagulante do leite, no processamento de alimentos, para amaciamento de carne (Ha et al., 2012; Kumari et al., 2012; Rawdkuen et al., 2013).

Em novos desenvolvimentos biotecnológicos e particularmente na engenharia de proteínas, há a previsão, em um futuro próximo, de proteases vegetais com

propriedades industriais novas (Feijoo-Siota; Villa, 2011) e por isso a busca por fontes econômicas e de fácil obtenção, que possam se adequar às exigências industriais é desejada, a exemplo da jaqueira (*Artocarpus heterophyllus* Lam.).

Hidrólise da caseína bovina pelo extrato enzimático da jaca

A Tabela 2 mostra o grau de hidrólise (%) nos diferentes ensaios realizados no planejamento. Os hidrolisados H2 ($36,25 \pm 0,80\%$), H4 ($37,84 \pm 1,68\%$) e H6 ($36,13 \pm 2,13\%$) apresentaram maiores grau de hidrólise, e não houve diferença significativa entre estes resultados ($p < 0,05$). Dessa forma, foi necessário avaliar o perfil eletroforético dos ensaios (Figura 2), possibilitando detectar qual propiciou maior hidrólise das frações de caseína bovina; como resultado, o ensaio H4 obtido através de relação enzima:substrato 1:50, temperatura de 40 °C e tempo de hidrólise de 24 horas foi considerado ideal para fracionamento por RP-HPLC, por hidrolisar completamente as frações de caseína, produzindo peptídeos de massas moleculares menores, uma vez que são citados na literatura como detentores de atividade biológica. Neste fracionamento, 16 frações foram obtidas (Figura 3) e analisadas quanto às atividades biológicas.

A hidrólise de proteínas pode ser realizada em três vias diferentes: ácida, alcalina e enzimática (Bunka et al., 2009), com a via enzimática, utilizando enzimas para obtenção de produtos derivados da caseína, sendo bastante utilizada (Bruno et al., 2010; Pontual et al., 2012). Nesse sentido, poucos estudos remetem-se à utilização de proteases vegetais na hidrólise de caseínas bovinas. Em trabalho recente, Luo et al. (2014) avaliou a ação de três enzimas sob a hidrólise de caseína bovina: papaína, tripsina e pancreatina. Dentre as três, a papaína mostrou-se mais efetiva que as demais, com valores de GH (%) variando de 13,32 a 22,06%; Zhao et al. (2011), em outro trabalho, obtiveram valores de grau de hidrólise variando de 8 a 14% quando da hidrólise de caseína bovina por papaína. Comparando com nossos resultados, as proteases encontradas no látex da jaca mostram maior eficiência catalítica quando comparada às papaínas utilizadas por aqueles autores nas respectivas condições de estudo.

Um planejamento fatorial completo 2^3 foi realizado a fim de avaliar o efeito das variáveis sob a hidrólise das caseínas bovinas pelas proteases da jaca, através da análise de três variáveis principais e suas interações. O coeficiente de determinação (R^2) calculado foi 0,77 e a regressão foi significativa; indicando que o modelo estatístico pode explicar 77% da variação na resposta. Nos resultados, todas as variáveis e interações tiveram efeito significativo ($p < 0,1$). Em relação às variáveis independentes, a relação enzima:substrato e temperatura apresentaram efeito negativo; e somente o tempo de hidrólise apresentou efeito positivo. Todas as interações apresentaram efeito negativo sob a hidrólise (Figura 4). Quanto à relação enzima:substrato, isto quer dizer que quanto menor esta relação, maior grau de hidrólise (%) será obtido. Isto é, particularmente interessante, visto que em processos industriais busca-se menor gasto com as matérias-primas utilizadas. Resultado semelhante foi encontrado por Lira et al. (2010), ao trabalharem com hidrólise de caseína caprina por papaína, com relações enzima:substrato de 1:100, 1:125 e 1:150. Para produção em escala industrial, o efeito negativo da temperatura representa em menor gasto de energia. Em relação ao tempo de hidrólise, Carreira et al. (2003) relata que tempos superiores a cinco horas não são desejáveis, pois pode favorecer contaminação do sistema hidrolítico por micro-organismos. Contudo, recente estudo realizado por Irshad et al. (2013), ao trabalharem com hidrólise de caseína bovina e avaliarem a atividade antioxidante, descobriram que a atividade possuiu correlação positiva com o grau de hidrólise nas condições estudadas, sugerindo que quanto maior o grau, maior será a atividade.

Atividade antimicrobiana do hidrolisado e das frações obtidas por RP-HPLC

A atividade antimicrobiana do hidrolisado H4, selecionado pelas características anteriormente citadas, está apresentada na Tabela 3. Houve inibição do crescimento microbiano frente às espécies *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae* em todas as concentrações testadas. Em *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* não houve inibição em nenhuma das concentrações. Entretanto, quando do fracionamento por cromatografia líquida de fase reversa, todas as frações derivadas do hidrolisado H4,

em concentração de 1 mg/mL, apresentaram atividade contra pelo menos um micro-organismo (Tabela 4). Das 16 frações, cinco apresentaram atividade antimicrobiana contra todas as bactérias testadas (FH1, FH7, FH10, FH11 e FH13), demonstrando que nos grupos de peptídeos coletados, há peptídeos com ampla atividade antimicrobiana frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

No geral, as bactérias *Enterococcus faecalis* e *Bacillus subtilis* foram menos inibidas, com 11 (FH1, FH2, FH4, FH6, FH7, FH9, FH10, FH11, FH12, FH13 e FH14) e cinco frações (FH1, FH7, FH10, FH11 e FH13) apresentando atividade antimicrobiana, respectivamente, apesar de Gram-positivas e relatadas pela literatura como mais sensíveis aos peptídeos antimicrobianos, devido ao envelope celular menos complexo em relação à estrutura e funcionalidade que às Gram-negativas (Floris et al., 2003). Entretanto, o que pode explicar a maior resistência destas bactérias aos peptídeos produzidos neste trabalho, é que estes podem apresentar vários mecanismos de indução à morte celular, com ação em alvos intracelulares, DNA, RNA e inibição de síntese de macromoléculas e enzimas bacterianas e não a ação sob a membrana celular (López-Expósito et al., 2008).

A produção de peptídeos com atividade antimicrobiana obtidos com a utilização de proteases vegetais para hidrólise de caseína bovina é escassa. Em um dos poucos trabalhos publicados, Arruda et al. (2012) trabalharam com hidrolisados de caseína bovina e suas respectivas frações obtidos através de hidrólise intermediada por proteases do látex de *Jacaratia corumbensis*. Neste trabalho, também encontraram atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*, com inibição completa do crescimento microbiano nas concentrações de 50 e 62,5 mg/mL, respectivamente. Quando comparado aos resultados obtidos no presente estudo, os hidrolisados obtidos com proteases do látex da jaca apresentaram atividade inibitória em até 0,25 mg/mL para os mesmos micro-organismos.

Hidrolisados de proteínas do leite são conhecidos por sua complexidade, chegando a possuir centenas de peptídeos diferentes; assim, comparações com hidrolisados de caseínas de outras espécies ou obtidas através de processo hidrolítico diferente é complicado, devido principalmente a diferenças no substrato proteico e das especificidades enzimáticas (Corrêa et al., 2011). Contudo, trabalhos

com utilização de enzimas digestivas para obtenção destes peptídeos são mais comuns. Realizada por McCann et al. (2006), a hidrólise da caseína bovina por pepsina produziu hidrolisado com atividade antimicrobiana contra *Listeria innocua*, uma bactéria Gram-positiva; e semelhante ao hidrolisado H4, não apresentou atividade frente à *Bacillus subtilis*. Estes autores fracionaram este hidrolisado por cromatografia de fase reversa, com obtenção de duas frações com atividade antimicrobiana contra *L. innocua* e, após sucessivos fracionamentos, obtiveram dois peptídeos, denominados de Cp1 e Cp2, que apresentaram atividade inibitória sob *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli* com concentração variando de 0,02 a 0,125 mg/mL e 0,25 a 0,332 mg/mL, respectivamente. Semelhante aos resultados observados no estudo destes autores, o hidrolisado H4 não apresentou atividade inibitória em nenhuma das concentrações testadas frente à *Bacillus subtilis*, entretanto, cinco frações obtidas apresentaram, em concentração de 1 mg/mL.

Essa observação também se aplica aos demais micro-organismos que não sofreram inibição pelo hidrolisado H4. Este fato pode ser explicado pela diminuição de material insolúvel (não hidrolisado) nas frações obtidas por HPLC, o que confere maior exposição dos aminoácidos e respectivas cargas, facilitando a interação dos peptídeos com a membrana microbiana.

Wu et al. (2013) trabalharam com hidrólise pancreática de caseína bovina para obtenção de peptídeos multifuncionais; e uma das atividades realizadas foi a antimicrobiana, frente à *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Nesse trabalho, os autores avaliaram sete frações, separadas por cromatografia de exclusão molecular, em concentrações de 1, 2 e 3,4 mg/mL. Esses autores encontram atividade antimicrobiana nas sete frações, com maior atividade inibitória na fração 4 a 2,7 contra *Escherichia coli* e maior atividade inibitória na fração 5 a 2 mg/mL frente *Staphylococcus aureus*. Similarmente ao nosso estudo, as frações obtidas por aqueles autores também apresentaram atividade frente *Staphylococcus aureus* a 1 mg/mL.

Atividade antioxidante do hidrolisado e das frações obtidas por RP-HPLC

As atividades antioxidantes em porcentagem e atividade antioxidante equivalente ao Trolox (**AAET**) estão apresentadas na Tabela 5. Em todas as concentrações testadas houve atividade antioxidante. A maior atividade foi detectada na concentração 5 mg/mL, que apresentou $95,08 \pm 0,46\%$ de atividade antioxidante e $955,83 \pm 4,66 \mu\text{M}$ de AAET. Um ensaio utilizando concentração de 10 mg/mL também foi realizado e a atividade antioxidante não pode ser calculada, devido ao sequestro completo do radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$, com valores de absorbância negativados (dados não mostrados).

Concentrações menores do hidrolisado (0,25 e 0,5 mg/mL) ainda apresentaram atividades de $9,61 \pm 0,41\%$ de atividade antioxidante e $87,24 \pm 4,12 \mu\text{M}$ de AAET; e $17,18 \pm 0,13\%$ de atividade antioxidante e $164,16 \pm 1,31 \mu\text{M}$ de AAET, respectivamente. Diante destes resultados, é possível afirmar que o hidrolisado H4 possui peptídeos doadores de elétrons que podem reagir com radicais livres, como o radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$ usado neste estudo, convertendo-os em produtos mais estáveis (Li et al., 2012), fato confirmado com a presença de atividade antioxidante em todas frações individuais, na concentração de 1 mg/mL (Tabela 6), com a fração FH9 apresentando atividade antioxidante de $94,94 \pm 0,60\%$ e AAET de $954,43 \pm 6,12 \mu\text{M}$. Comparativamente, a fração FH1 apresentou $4,78 \pm 1,62\%$ e $38,11 \pm 16,47 \mu\text{M}$ de atividade antioxidante (%) e AAET, respectivamente, considerada a menor atividade obtida das frações; revelando que a fração FH9 possui a maior atividade antioxidante de todas as frações coletadas e testadas.

Moslehishad et al., (2013), em trabalho com frações de leite bovino hidrolisado através de fermentação por *Lactobacillus rhamnosus* PTCC 1637, apresentou valores de AAET variando de 110,41 a 745,35 μM , enquanto as frações obtidas neste estudo apresentaram AAET variando de 38,11 a 954,43 μM . Esses resultados demonstram que as frações obtidas da caseína, além de possuírem atividade antimicrobiana, também possuem atividade antioxidante, caracterizando-se como peptídeos multifuncionais.

É interessante relatar que estudos para obtenção de peptídeos antioxidantes a partir de caseína bovina com utilização de proteases vegetais como agentes

hidrolíticos são escassos. Até o presente momento, grande parte das pesquisas realizadas envolvem a utilização de bactérias ácido-láticas (Chang et al., 2013; Moslehishad et al., 2013), enzimas digestivas (Chen et al., 2012) e de fonte microbianas conhecidas, como a alcalase (Xie et al., 2013).

Recentemente, Pierro et al. (2014) investigaram a utilização de protease obtida do látex de *Ficus carica* L. quanto à sua habilidade de produção de peptídeos antioxidantes derivados de caseína bovina. Neste trabalho, a atividade antioxidante dos produtos gerados foi avaliada através da capacidade de absorção do oxigênio radical. Os hidrolisados apresentaram atividade antioxidante *in vitro* significativa, corroborando aos achados deste estudo, demonstrando que a utilização de proteases vegetais na produção de peptídeos bioativos é viável e apresenta vantagens em relação às demais, principalmente no que concerne à satisfação de necessidades específicas devido à dieta e/ou questões religiosas, como os próprios autores relatam.

Atividade quelante de Cu^{2+} do hidrolisado e das frações obtidas por RP-HPLC

As atividades quelantes de Cu^{2+} do hidrolisado e das frações de peptídeos estão apresentadas nas tabelas 7 e 8, respectivamente. O hidrolisado apresentou atividade quelante em todas as concentrações testadas, com valores variando de $32,38 \pm 2,79$ a $18,59 \pm 1,46\%$. Quando da análise das frações, quatro (FH2, FH9, FH12 e FH13) apresentaram atividade, com as frações FH12 e FH9 com resultados de $28,28 \pm 4,41$ e $18,50 \pm 1,15\%$, consideradas as atividades mais altas. A atividade quelante de íons se caracteriza em atividade antioxidante, já que metais de transição como o cobre, podem catalisar a geração de espécies reativas de oxigênio (**EROS**), incluindo os radicais hidroxil e o superóxido, resultando em peroxidação lipídica e em dano ao DNA (Zhuang et al., 2013). Dessa forma, acumulação excessiva desse tipo de metal pode levar ao estresse oxidativo, responsável por inúmeras patologias, como câncer, doenças cardiovasculares, diabetes, entre outros (Jomova; Valko, 2011). Em alimentos, a utilização de compostos que apresentem este tipo de atividade é importante na prevenção da rancidez, que altera o sabor dos alimentos (Hogan et al., 2009).

A atividade quelante obtida das quatro frações pode ser explicada devido ao conteúdo de histidina que cada fração possa apresentar. Recentemente, foi relatado que altos teores deste aminoácido (20-30%) fornecem valores mais altos de atividade quelante de Cu^{2+} (Torres-Fuentes et al., 2011).

As frações FH9, FH12 e FH13 apresentaram maiores tempos de retenção no cromatograma, o que caracteriza uma afinidade mais forte à fase estacionária da coluna empregada neste estudo, que apresenta característica hidrofóbica. Dessa forma, pode-se entender que estas frações possuam características mais hidrofóbicas que hidrofílicas. Este fato pode ser outra possível explicação para este resultado, pois aminoácidos hidrofóbicos são relatados também na literatura como capazes de quelar íons metálicos (Corrêa et al., 2011).

Poucos trabalhos relatam atividade quelante de cobre em hidrolisados e frações peptídicas de caseína bovina. Entretanto, similarmente aos achados deste estudo, vários trabalhos já realizados demonstram que hidrolisados e peptídeos derivados de fontes alimentícias possuem atividade quelante de Cu^{2+} relevante (Torres-Fuentes et al., 2011; Carrasco-Castilla et al., 2012; Durak et al., 2013).

CONCLUSÕES

Peptídeos apresentando atividade antimicrobiana, antioxidante e quelante de Cu^{2+} foram produzidos através da hidrólise de caseínas bovinas por proteases encontradas no látex da jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.). Para fins industriais, o fato de várias frações serem multifuncionais, ou seja, possuírem mais de uma atividade biológica é interessante, devido ao baixo custo de produção e pela possibilidade de ampla aplicação destes peptídeos em indústrias alimentícias e farmacêuticas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o suporte financeiro dado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Central Laboratorial de

Apoio à Pesquisa da Unidade Acadêmica de Garanhuns (CENLAG) pela infraestrutura e ao Centro de Tecnologias do Nordeste (CETENE).

REFERÊNCIAS

- Adler-Nissen, J. 1979. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *J. Agric. Food Chem.* 27:1256–1262.
- Ageyi, D., e M. K. Danquah, 2011. Industrial-scale manufacturing of pharmaceutical-grade bioactive peptides. *Biotechnol. Adv.* 29:272–277.
- Alencar, R. B. M. M. Biondi, P. M. G. Paiva, V. L. A. Veira, L. B. J. R. Carvalho, R. S. Bezerra. 2003. Alkaline proteases from digestive tract of four tropical fishes. *Braz J Food Technol.* 6:279-284.
- AOAC. 2000. Official methods of analysis. Association of Official Analytical Chemist. EUA.
- Arruda, M. S., F. O. Silva, A. S. Egito, T. M. S. Silva, J. L. Lima-Filho, A. L. F. Porto, e K. A. Moreira. 2012. New peptides obtained by hydrolysis of caseins from bovine milk by protease extracted from the latex *Jacaratia corumbensis*. *Food Sci and Technol.* 49:73-79.
- Benkerroum, N. 2010. Antimicrobial peptides generated from milk proteins: a survey and prospects for application in the food industry. A review. *Int J Dairy Technol.* 63:320-338.
- Bruno, M. A., C. M. Lazza, M. E. Errasti, L. M. I. López, N. O. Caffini, e M. F. Pardo, 2010. Milk clotting and proteolytic activity of an enzyme preparation from *Bromelia hieronymi* fruits. *Food Sci. Technol.*, 43, 695-701.
- Bunka, F., O. Kriz, A. Velicková, L. Bunková, e S. Krácmár. 2009. Effect of acid hydrolysis time on amino acid determination in casein and process cheeses with different fat content. *J Food Compost Anal.* 22:224-232
- Carrasco-Castilla, J., A. J. Hernández-Álvarez, C. Jiménez-Martínez, C. Jacinto-Hernández, M. Alaiz, J. Girón-Calle, J. Vioque, e G. Dávila-Ortiz. 2012. Antioxidant and metal chelating activities of peptide fractions from phaseolin and bean protein hydrolysates. *Food Chem.* 135:1789-1795.
- Carreira, R. L., V. D. M Silva, H. A. Moraes, S. Motta, R. G. Junqueira, e M. P. C Silvestre. 2003. Otimização da hidrólise da caseína para elevar o teor de pequenos peptídeos: emprego da pepsina. *Ciênc. Agrotec.* 27:625-634
- Chang, O. K., K. H. Seol, S. G. Jeong, M. H. Oh, B. Y. Park, C. Perrin, e J. S. Ham. 2013. Casein hydrolysis by *Bifidobacterium longum* KACC91563 and antioxidant activities of peptides derived therefrom. *J Dairy Sci.* 96:5544-5555.
- Chen, M., e B. Li. 2012. The effect of molecular weights on the survivability of casein-derived antioxidant peptides after the simulated gastrointestinal digestion. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 16:341-448

- Chowdhury, F. A., M. D. A. Raman, e J. Mian. 1997. Distribution of free sugars and fatty acids in jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*). Food Chem. 60:25–28.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards. M7-A6, 2003.
- Corrêa, A. P. F., D. J. Dairot, J. Coelho, S. M. M. Meira, F. C. Lopes, J. Segalin, P. H. Risso, e A. Brandelli. 2011. Antioxidant, antihypertensive and antimicrobial properties of ovine milk caseinate hydrolyzed with a microbial protease. J Sci Food Agric. 91: 2247–2254.
- Durak, A., B. Baraniak, A. Jakubczyk, e M. Swieca. 2013. Biologically active peptides obtained by enzymatic hydrolysis of Adzuki bean seeds. Food Chem. 141:2177–2183.
- Egito, A. S., G. M. S. Rosinha, L. E. Laguna, L. Miclo, J. M. Girardet, e J. L. Gaillard. 2006. Fast electrophoretic detection method of adulteration of caprine milk by bovine milk. Arq Bras Med Vet Zootec. 58:932-939.
- Egito, A. S., J. M. Girardet, L. E. Laguna, C. Poirson, D. Mollé, L. Miclo, G. Humbert, e J.-L. Gaillard. 2007. Milk-clotting activity of enzyme extracts from sunflower and albizia seeds and specific hydrolysis of bovine κ -casein. Int. Dairy J. 17:816-825.
- Feijoo-Siota, L., e T. G. Villa. 2011. Native and biotechnologically engineered plant proteases with industrial applications. Food Bioprocess Technol. 4:1066–88.
- Ferreira, D. F. 2000. Análises estatísticas por meio do SISVAR para Windows versão 4.0. In: Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria, São Carlos: UFSCar, 255 258.
- Floris, R., I. Recio, B. Berkhout, e S. Visser. 2003. Antibacterial and antiviral effects of milk proteins and derivatives thereof. Curr Pharm Design. 9:1257–1275.
- Fonseca, K. C., N. C. Morais, M. R. Queiroz, M. C. Silva, M. S. Gomes, J. O., Costa, C. C. Mamede, F. S. Torres, N. Penha-Silva, M. E. Beletti, H. A. Canabrava, e F. Oliveira. 2010. Purification and biochemical characterization of Eumiliin from *Euphorbia milii* var. *hislopii* latex. Phytochemistry. 71:708-715.
- Ha, M., A. E. A. Bekhit, A. Carne, e D. L Hopkins. 2012. Characterisation of commercial papain, bromelain, actinidin and zingibain protease preparations and their activities toward meat proteins. Food Chem. 134:95–105
- Hernández-Ledesma, B., M. M Contreras, e I. Recio. 2011. Antihypertensive peptides: production, bioavailability and incorporation into foods. Adv. Colloid Interface Sci. 165:23-35.
- Hogan, S., L. Zhang, J. Li, H. Wanga, e K. Zhou. 2009. Development of antioxidant rich peptides from milk protein by microbial proteases and analysis of their effects on lipid peroxidation in cooked beef. Food Chem. 117:438-443.
- Irshad, I., A. Kanekanian, A. Peters, e T. Masud. 2013. Antioxidant activity of bioactive peptides derived from bovine casein hydrolysate fractions. J Food Sci Technol. 1-9.

- Jauhiainen, T., R. Korpela. 2007. Milk peptides and blood pressure. *J. Nutr.*, 137:825-829, 2007.
- Jomova, K., e M. Valko. 2011. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*. 283:65–87.
- Kitts, D. D., e K. Weiler. 2003. Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocess used in isolation and recovery. *Curr. Pharm. Des.* 9:1309-1323.
- Korhonen, H. 2009. Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. *J Funct Foods*. 1:177-187.
- Kumari, M., A. Sharma, e M. V. Jagannadham. 2012. Religiosin B, a milk-clotting serine protease from *Ficus religiosa*. *Food Chem.* 131:295-1303.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685
- Li, Z., A. Jiang, T. Yue, J. Wang, Y. Wang, e J. Su. 2012. Purification and identification of five novel antioxidant peptides from goat milk casein hydrolysates. *J. Dairy Sci.* 96:4242–4251.
- Lira, T. B. F., V. S. Bezerra, F. O. Silva, G. M. P. Dias, J. L. Lima-Filho, T. S. Porto, e A. L. F. Porto. 2010. Avaliação de variáveis que influenciam a hidrólise enzimática da caseína do leite de cabra Moxotó. *Pesq. Agropec. Bras.* 45:1036-1043.
- López-Expósito, I., L. Amigo, e I. Recio. 2008. Identification of the initial binding sites of α_{s2} -casein f(183–207) and effect on bacterial membranes and cell morphology. *Biochim. Biophys. Acta*. 1778:2444–2449.
- Luo, Y. C., K. Pan, e W. Zhong. 2014. Physical, chemical and biochemical properties of casein hydrolyzed by three proteases: partial characterizations. *Food Chem.* 55:146-154.
- McCann, K. B., B. J. Shiell, W. P. Michalski, A. Lee, J. Wan, H. Roginski, e M. J. Coventry. 2006. Isolation and characterisation of a novel antibacterial peptide from bovine α_{s1} -casein. *Int. Dairy J.* 16:316-323.
- Moro, L. P., H. Cabral, D. N. Okamoto, I. Hirata, M. A. Juliano, L. Juliano, e G. O. Bonilla-Rodriguez. 2013. Characterization, subsite mapping and N-terminal sequence of miliin, a serine-protease isolated from the latex of *Euphorbia milii*. *Process Biochem.* 48:633-637.
- Moslehishad, M., M. R. Ehsani, M. Salami, S. Mirdamadi, H. Ezzatpanah, A. N. Naslaji, A. A. Moosavi-Movahedi. 2013. The comparative assessment of ACE-inhibitory and antioxidant activities of peptide fractions obtained from fermented camel and bovine milk by *Lactobacillus rhamnosus* PTCC 1637. *Int. Dairy J.* 29:82-87.
- Phelan, M., A. Aherne, R. J. Fitzgerald, e N. M. O'brien. 2009. Casein-derived bioactive peptides: Biological effects, industrial uses, safety aspects and regulatory status. *Int. Dairy J.* 19:643-654.

- Pierro, G. D., M. B. O’Keeffe, A. Poyarkov, G. Lomolino, e R. J. FitzGerald. Antioxidant activity of bovine casein hydrolysates produced by *Ficus carica* L - derived proteinase. Food Chem. *In press* 2014.
- Pihlanto, A. 2006. Antioxidative peptides derived from milk proteins. Int. Dairy J. 16:1306–1314
- Pontual, E. V., B. E. A. Carvalho, R. S. Bezerra, L. C. B. B. Coelho, T. H. Napoleão, e P. M. G. Paiva. 2012. Caseinolytic and milk-clotting activities from *Moringa oleifera* flowers. Food Chem. 135:1848-1854
- Prasad, K. M. R., e T. K. Virupakshat. 1990. Purification and characterization of a protease from jackfruit latex. Phytochemistry. 39:1763-1766.
- Rawdkuen, S., M. Jaimakreu, e S. Benjakul. 2013. Physicochemical properties and tenderness of meat samples using proteolytic extract from *Calotropis procera* latex. Food Chem. 136:909-916
- Re, R., N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, e C. Rice-Evans. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic. Biol. Med. 26:1231–1237.
- Saiga, A., S. Tanabe, e T. Nishimura. 2003. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. J. Agric. Food Chem. 51:3661–3667.
- Schägger, H., e G. V. Jagow. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. Anal. Biochem. 166:368-379
- Silva, A. C., T. C. E. S. Nascimento, S. A. Silva, P. N. Herculano, e K. A. Moreira, Potential of quixaba (*Sideroxylon obtusifolium*) latex as a milk-clotting agent. 2013. Food Sci Technol. 33:494-499
- Silva, A. V., e F. X. Malcata. 2005. Caseins as source of bioactive peptides. Int. Dairy J. 15:1-15.
- Siritapetawee, S., S. Thammasirirak , e W. Samosornsuk. 2012. Antimicrobial activity of a 48-kDa protease (AMP48) from *Artocarpus heterophyllus* latex. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 16: 132-137.
- Su, R., M. Liang, W. Qi, R. Liu, S. Yuan, e Z. He. 2012. Pancreatic hydrolysis of bovine casein: Peptide release and time-dependent reaction behavior. Food Chem. 133:851–858
- Tavano, O. L. 2013. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. J. Mol. Catal.: B Enzym. 90:1–11.
- Torres-Fuentes, C., M. Alaiz, e J. Vioque. 2011. Affinity purification and characterisation of chelating peptides from chickpea protein hydrolysates. Food Chem. 129:485–490.
- Wu, S.; W. Qi, T. Li, D. Lu, R. Su, Z. He, 2013. Simultaneous production of multi-functional peptides by pancreatic hydrolysis of bovine casein in an enzymatic membrane reactor via combinational chromatography. Food Chem. 141:2944-2951.

- Xie, N., C. Wang, T. Yue, J. Ao, e B. Li. 2013. Non-gastrointestinal-hydrolysis enhances bioavailability and antioxidant efficacy of casein as compared with its *in vitro* gastrointestinal digest. Food Res. Int. 51:114–122.
- Zhao, X. H., D. Wu, e T. J. Li. 2010. Preparation and radical scavenging activity of papain-catalyzed casein plasteins. Dairy Sci. Technol. 90:521–535.
- Zhuang, H., N. Tanga, e Y. Yuan. 2013. Purification and identification of antioxidant peptides from corn gluten meal. J Funct Foods. 5:1810-1821.

TABELAS

Tabela 1. Matriz do planejamento fatorial 2^3 para avaliação dos efeitos de parâmetros sob o grau de hidrólise (%) da caseína bovina pelo extrato enzimático da jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.)

Variável	Inferior	Central	Superior
Relação Enzima:Substrato	1:50	1:100	1:150
Temperatura (°C)	28	34	40
Tempo de hidrólise (h)	8	16	24

Tabela 2. Matriz do planejamento fatorial 2^3 com as diferentes combinações de ensaios realizados (H1-H11) e resultado da variável resposta.

Hidrolisados	Relação Enzima:Substrato	Temperatura (°C)	Tempo de hidrólise (h)	Grau de hidrólise (%)
H1	1:50 (-)	28 (-)	8 (-)	32,56 ± 2,68 ^b
H2	1:50 (-)	28 (-)	24 (+)	36,25 ± 0,80 ^a
H3	1:50 (-)	40 (+)	8 (-)	30,82 ± 2,40 ^b
H4	1:50 (-)	40 (+)	24 (+)	37,84 ± 1,68 ^a
H5	1:150 (+)	28 (-)	8 (-)	30,92 ± 2,51 ^b
H6	1:150 (+)	28 (-)	24 (+)	36,13 ± 2,13 ^a
H7	1:150 (+)	40 (+)	8 (-)	31,27 ± 0,80 ^b
H8	1:150 (+)	40 (+)	24 (+)	30,08 ± 2,35 ^b
H9	1:100 (0)	34 (0)	16 (0)	32,14 ± 1,84 ^b
H10	1:100 (0)	34 (0)	16 (0)	31,94 ± 2,15 ^b
H11	1:100 (0)	34 (0)	16 (0)	31,66 ± 2,10 ^b

¹ Os dados estão representados pela média de três ensaios ± desvio-padrão;

² Valores seguidos de letras iguais não apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Tabela 3. Atividade antimicrobiana do hidrolisado H4, constituído pela relação enzima:substrato 1:50, temperatura a 40 °C e tempo de hidrólise 24 h frente à bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Micro-organismo	H4					
	Concentrações mg/mL					
	10	5	2,5	1	0,5	0,25
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	+	+	+	+

¹O símbolo (-) representa inibição do crescimento das bactérias testadas; e o símbolo (+) sem inibição do crescimento das bactérias testadas.

Tabela 4. Atividade antimicrobiana das frações (FH1-FH16) coletadas por HPLC do hidrolisado H4, frente às bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Micro-organismo	H4															
	Frações coletadas															
	FH1	FH2	FH3	FH4	FH5	FH6	FH7	FH8	FH9	FH10	FH11	FH12	FH13	FH14	FH15	FH16
<i>E. faecalis</i>	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>B. subtilis</i>	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

¹O símbolo (-) representa inibição do crescimento das bactérias testadas; e o símbolo (+) sem inibição do crescimento das bactérias testadas.

Tabela 5. Atividade antioxidante do hidrolisado H4, constituído pela relação enzima:substrato 1:50, temperatura a 40 °C e tempo de hidrólise 24 h, em várias concentrações. Valores de atividade antioxidante são expressos em (%) e atividade antioxidante equivalente ao Trolox (AAET).

H4					
	Concentrações mg/mL				
	5	2,5	1	0,5	0,25
Atividade antioxidante (%)	95,08 ± 0,46	69,23 ± 1,09	32,49 ± 0,53	17,18 ± 0,13	9,61 ± 0,41
AAET (µM)	955,83 ± 4,66	693,06 ± 11,12	319,68 ± 5,37	164,16 ± 1,31	87,24 ± 4,12

¹ Os dados estão representados pela média de três ensaios ± desvio-padrão.

Tabela 6. Atividade antioxidante das frações (FH1-FH16) coletadas por HPLC do hidrolisado H4. Valores de atividade antioxidante são expressos em (%) e atividade antioxidante equivalente ao Trolox (AAET).

H4		
Frações coletadas	Atividade antioxidante (%)	AAET (µM)
FH1	4,78 ± 1,62	38,11 ± 16,47
FH2	25,41 ± 0,50	247,82 ± 5,03
FH3	36,77 ± 0,57	363,2 ± 5,82
FH4	14,14 ± 1,00	133,28 ± 10,19
FH5	20,44 ± 0,51	197,28 ± 5,21
FH6	52,18 ± 2,76	519,85 ± 28,02
FH7	35,69 ± 2,56	352,25 ± 26,06
FH8	32,62 ± 2,22	321,09 ± 22,61
FH9	94,94 ± 0,60	954,43 ± 6,12
FH10	60,88 ± 3,18	608,28 ± 32,30
FH11	42,24 ± 1,72	418,78 ± 17,51
FH12	24,01 ± 1,32	233,5 ± 13,40
FH13	26,08 ± 1,61	254,55 ± 16,39
FH14	12,98 ± 1,01	121,49 ± 10,23
FH15	50,03 ± 2,16	497,95 ± 21,99
FH16	14,64 ± 1,94	138,33 ± 19,68

¹ Os dados estão representados pela média de dois ensaios ± desvio-padrão

Tabela 7. Atividade quelante de Cu^{2+} do hidrolisado H4, constituído pela relação enzima:substrato 1:50, temperatura a 40 °C e tempo de hidrólise 24 h, em várias concentrações. Valores de atividade quelante são expressos em (%).

H4						
	Concentrações mg/mL					
	10	5	2,5	1	0,5	0,25
Atividade quelante (%)	32,38 ± 2,79	27,79 ± 5,37	27,9 ± 4,06	22,17 ± 4,45	23,09 ± 2,44	18,59 ± 1,46

¹ Os dados estão representados pela média de três ensaios ± desvio-padrão

Tabela 8. Atividade quelante de Cu^{2+} das frações (FH1-FH16) coletadas por HPLC do hidrolisado H4. Valores de atividade antioxidante são expressos em (%) e atividade antioxidante equivalente ao Trolox (AAET).

H4	
Frações coletadas	Atividade quelante (%)
FH1	-
FH2	4,07 ± 1,76
FH3	-
FH4	-
FH5	-
FH6	-
FH7	-
FH8	-
FH9	18,50 ± 1,15
FH10	-
FH11	-
FH12	28,28 ± 4,41
FH13	15,71 ± 2,05
FH14	-
FH15	-
FH16	-

¹Os dados estão representados pela média de dois ensaios ± desvio-padrão;

²O símbolo (-) representa falta de atividade.

FIGURAS

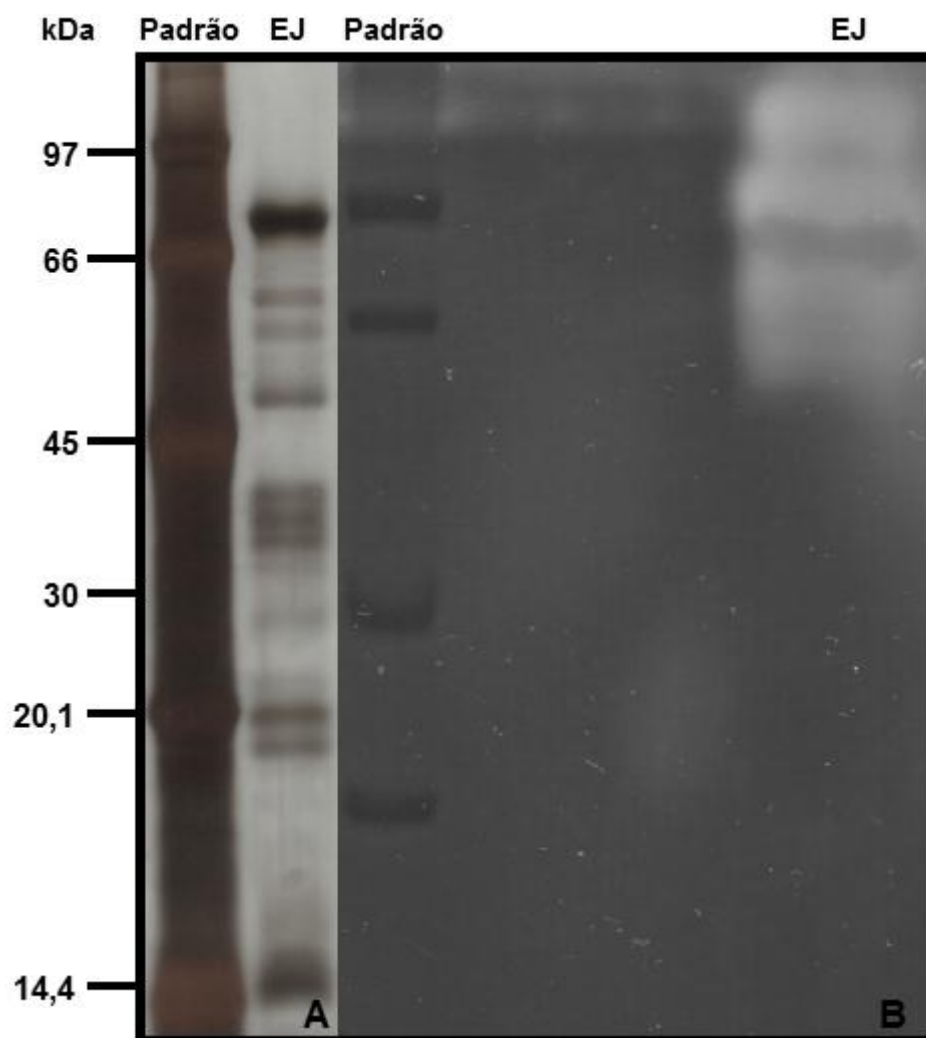


Figura 1. Perfil eletroforético em SDS-PAGE (A) e zimograma na presença de gelatina a 0,1% (B) do extrato da jaca (EJ).

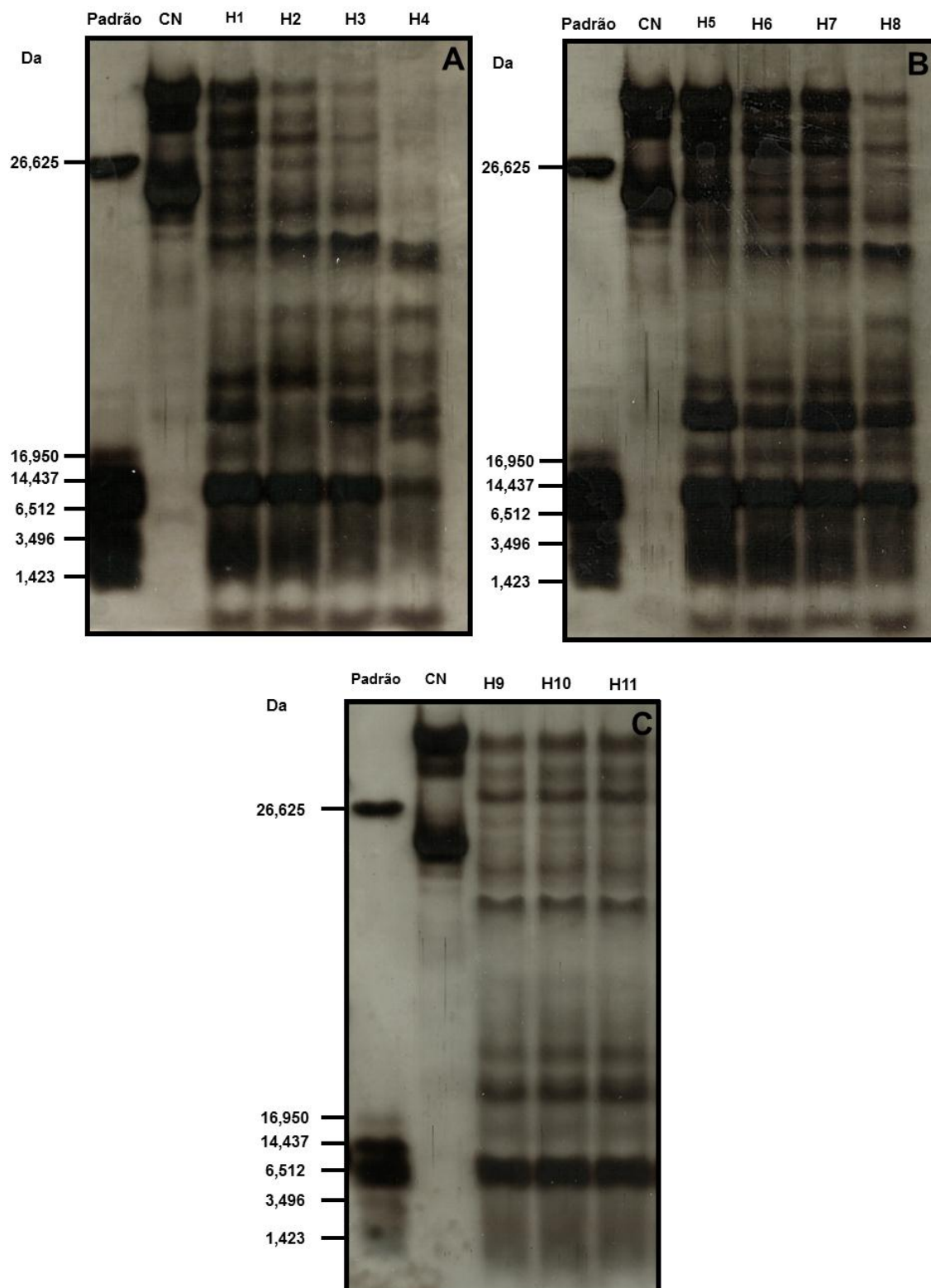


Figura 2. Perfil eletroforético em Tricina-SDS-PAGE da caseína não hidrolisada (CN), dos hidrolisados H1-H4 (A), H5-H8 (B) e H9-H11 (C) gerados a partir da hidrólise da caseína pelo extrato enzimático da jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.).

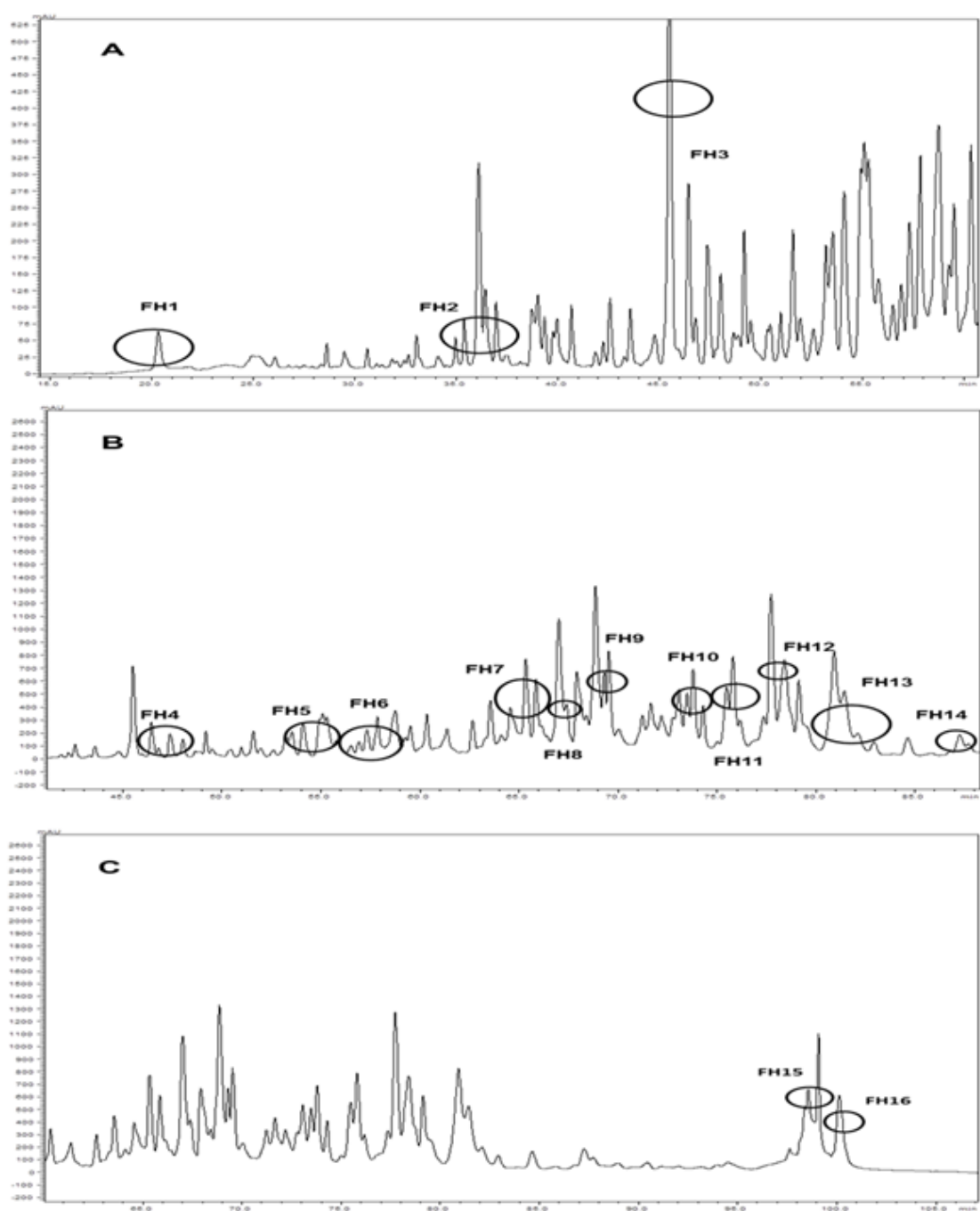


Figura 3. Cromatografia líquida de alta eficiência do hidrolisado H4, com as frações coletadas FH1-FH3 (A), FH4-FH14 (B) e FH15-FH16 (C) circulas em preto.

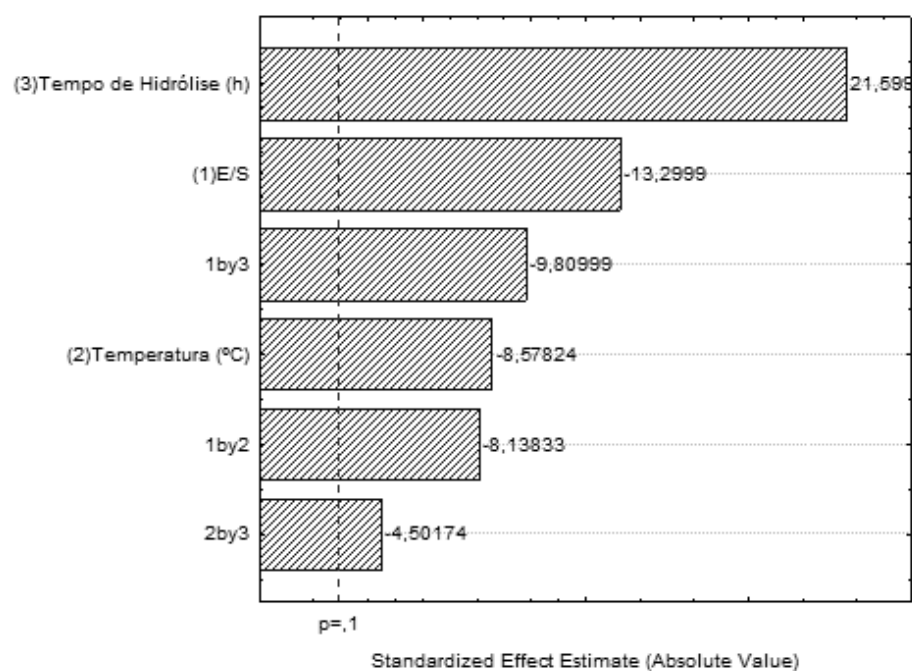


Figura 4. Gráfico de Pareto dos efeitos das variáveis relação enzima:substrato, temperatura (°C) e tempo de hidrólise (h) e interações sob o grau de hidrólise das caseínas bovinas por proteases do látex da jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No desenvolvimento do presente estudo, foi possível observar que a hidrólise de caseínas bovinas intermediadas por proteases presentes no látex da jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) gerou peptídeos com atividade biológica, como os encontrados em nosso trabalho: peptídeos antimicrobianos, antioxidantes e queladores de Cu^{2+} . Esses peptídeos constituem-se fontes promissoras no uso em indústrias alimentícias e farmacêuticas, visto que apresentaram excelentes resultados.