



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

EDSON FLÁVIO TEIXEIRA DA SILVA

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE PEPTÍDEOS ORIUNDOS DE PROTEÍNAS
DA CLARA DO OVO CAIPIRA

RECIFE - PE

2020



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

EDSON FLÁVIO TEIXEIRA DA SILVA

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE PEPTÍDEOS ORIUNDOS DE PROTEÍNAS
DA CLARA DO OVO CAPIRA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Biociência Animal.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Keila Aparecida Moreira (UFAPE)

RECIFE – PE

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- S586a Silva, Edson Flávio Teixeira da Silva
Atividade antimicrobiana de peptídeos oriundos de proteínas clara do ovo caipira / Edson Flávio Teixeira da Silva Silva. - 2020.
71 f.
- Orientador: Keila Aparecida Moreira.
Inclui referências.
- Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Recife, 2020.
1. Galinha caipira. 2. Sonicação. 3. Hidrólise proteica. 4. Peptídeos bioativos. 5. Antimicrobiano. I. Moreira, Keila Aparecida, orient. II. Título

CDD 636.089

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

Parecer da comissão examinadora da defesa de dissertação do mestrado de

EDSON FLÁVIO TEIXEIRA DA SILVA

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE PEPTÍDEOS ORIUNDOS DE PROTEÍNAS
DA CLARA DO OVO CAIPIRA

Defesa apresentada e aprovada pela comissão examinadora:

Prof^ª. Dr^ª. Keila Aparecida Moreira (Presidente)

Universidade Federal do Agreste de Pernambuco (UFAPE)

Prof^ª. Dr^ª. Daniele Silva Ribeiro (Membro externo)

Universidade Federal do Agreste de Pernambuco (UFAPE)

Prof. Dr. Pedro Gregório Vieira Aquino (Membro externo)

Universidade Federal do Agreste de Pernambuco (UFAPE)

RECIFE - PE

2020

Para **Maria José da Silva e Edleide
Teixeira da Silva**, por todo
acolhimento, parceria e suporte de
vida...

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço as minhas duas mães, **Maria José da Silva** (*Mãe, Avó e Anjo da guarda*) e **Edleide Teixeira da Silva** (*Mãe, Tia, Madrinha e Anjo da guarda*) por me acolherem antes mesmo do meu primeiro suspiro, hoje sabemos que antes de tomarmos ciência dos laços fraternos que seriam formados (...) “já estava escrito”. Serei eternamente grato por me permitirem entrar nas suas vidas, por todo amor, apoio, confiança, por tratar minha educação como prioridade, pelos conselhos, direcionamentos e bons exemplos, sempre lembrados e repetidos. Agradeço aos meus familiares, por se espelharem em mim como exemplo de progresso educacional, pelo apoio e suporte de vida.

A minha orientadora **Keila Moreira**, que desde o 2º período da minha graduação em Medicina Veterinária se faz presente na minha vida, agradeço pelos direcionamentos, dedicação, incentivos, conselhos, por me permitir caminhar rumo à pesquisa e docência. Serei eternamente grato, nessa e em outras vidas, pelo olhar atento em um momento delicado na minha vida, pela percepção e encaminhamento para o devido auxílio médico, quando em mim nada mais existia.

A minha amiga **Aline Gleyce Julião Bomfim**, por chegar de “mansinho”, permitir ser cativada e também por me cativar, por toda a partilha de sabedoria nos dias de trabalho no laboratório, pela parceria na execução dos experimentos até altas horas, incluindo os frequentes finais de semana, pelas sábias palavras ditas nos momentos de angústia e principalmente por celebrarmos juntos às nossas conquistas.

Ao meu amigo **Wellington Leal dos Santos**, por toda a parceria no trabalho e na vida desde o ano de 2013 quando ainda éramos alunos de graduação e estávamos “engatinhando” na jornada científica, pelo auxílio na quebra de paradigmas e preconceitos, foram altos e baixos, aproximações e distanciamentos, mas ainda assim permanece a amizade e o respeito pelo ser humano, pela pessoa e pela criança que o habita.

Aos meus grandes amigos que tive o prazer de encontrá-los em minha jornada terrena, **Leanderson Pereira, Andresa Fernandes e Sandra Miranda** obrigado pela partilha diária, pela troca mútua de afeto. Sabemos que sementes

foram plantadas e que apesar do livre arbítrio acerca das nossas escolhas, tudo já estava escrito, nos encontraríamos de qualquer forma em alguma outra estrada da vida.

Sou grato a **Anna Carolina, Alana Emília e Talita Camila** por toda contribuição e incentivo para o crescimento pessoal e profissional desde a minha primeira iniciação científica. São três pessoas tão diferentes e únicas, contudo, extremamente semelhantes na busca por seus ideais. Mostraram-me o que é não desistir diante das repetições de experimentos, mesmo quando não parecia dar certo. Foram tantas histórias, tantos momentos de luta e gratidão, muitas vezes regados por tardes de café e cantoria para dar uma levantada no astral.

Agradeço também aos meus colegas de laboratório pela partilha da carga emocional e de trabalho, especialmente a **Maria Emília** e as alunas de iniciação científica **Maria Alane e Thayná Alcília**, pela dedicação e compromisso na busca pelo aprendizado diário. Deixo o meu agradecimento aos antigos alunos de iniciação científica **Thailan Arlindo, José Jeyvson, Gleidson Costa e Lucas Henrique** pelo aprendizado mútuo.

Aos professores da Universidade Federal do Agreste de Pernambuco **Marcelo Mendonça, Daniele Ribeiro e Elizabeth Rodrigues** pelas devidas orientações e direcionamentos durante o processo de qualificação da dissertação e pelos direcionamentos quanto à execução dos experimentos microbiológicos.

Sou grato aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da UFRPE pela partilha do conhecimento, por mostrar novos caminhos para o exercício da docência e o desenvolvimento da ciência. Agradeço a professora **Tatiana Porto** que além de ser uma pessoa “ímpar”, demonstrou-se uma líder como coordenadora do programa sempre atenta as lacunas e transparente quanto aos objetivos para o desenvolvimento pessoal e científico dos alunos. Agradeço ao professor **Rinaldo Mota**, vice coordenador, por todo o suporte na gestão do programa.

Agradeço a todos que compõem a **Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE**, especialmente a **Universidade Federal do Agreste de Pernambuco** antiga **Unidade Acadêmica de Garanhuns (UFRPE - UAG)** por

me proporcionar uma educação superior de qualidade durante a graduação e por ceder as instalações e equipamentos da Central Analítica para a execução dos experimentos científicos do mestrado.

A **CAPES** pelo auxílio financeiro, imprescindível para a execução e finalização do projeto de pesquisa.

“Não há saber mais ou saber menos:
há saberes diferentes.”

Paulo Freire

RESUMO

Proteínas alimentares são fontes naturais de substâncias bioativas, como os peptídeos com ação antimicrobiana, estas biomoléculas apresentam amplo espectro de ação microbicida, tornando-se uma alternativa natural no combate as cepas multirresistentes aos fármacos tradicionalmente comercializados nas terapêuticas antimicrobianas. Diante disso, objetivou-se com este trabalho, prospectar peptídeos antibacterianos com massa molecular menor que 3 kDa a partir de proteínas da clara do ovo caipira, pré-tratada por sonicação ultrassônica (40 kHz), em seguida submetida a proteólise enzimática. O percentual máximo de $32,40 \pm 0,10\%$ de hidrólise das proteínas foi encontrado a partir de inferências estatísticas resultantes entre a combinação de diferentes tempos de sonicação e hidrólise enzimática, onde os tempos ótimos foram 15 minutos e 5 segundos para a sonicação, e 128 minutos e 13 segundos para a hidrólise enzimática. O ensaio que apresentou maior grau de hidrólise foi submetido ao fracionamento por meio de ultrafiltração em membrana de corte com porosidade de 3 kDa. A fração contendo peptídeos com massa molecular menor que 3kDa foi submetida a avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração microbicida mínima (CMM) frente à nove cepas bacterianas de referência. Para o microrganismo *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 os valores de CIM e CMM foram definidos em $90 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e para as cepas *Listeria monocytogenes* ATCC 19114, e *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 os valores de CIM e CMM foram $1\mu\text{g.mL}^{-1}$. Para as cepas *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enteritidis* ATCC 31194, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, e *Serratia marcescens* ATCC 13880 as CIM e CMM foram definidas como 90 ng.mL^{-1} . Demonstrando o grande potencial bactericida da fração peptídica prospectada a partir hidrólise enzimática das proteínas da clara do ovo caipira previamente submetidas à sonicação. Desta forma, a proteólise proposta é eficiente para a prospecção de peptídeos bioativos com atividade antibacteriana.

Palavras-chave: Peptídeos antimicrobianos, ovo caipira, hidrólise proteica, sonicação; 40kHz.

ABSTRACT

Food proteins are natural sources of bioactive substances, such as peptides with antimicrobial action, these biomolecules have a broad spectrum of microbicidal action, becoming a natural alternative to combat multidrug-resistant strains to drugs traditionally marketed in antimicrobial therapies. Therefore, the objective of this work was to prospect antibacterial peptides with molecular mass less than 3 kDa from free range egg white proteins, pre-treated by ultrasonic sonication (40 kHz), then submitted to enzymatic proteolysis. The maximum percentage of 32.40 ± 0.10% of protein hydrolysis was found from statistical inferences resulting from the combination of different sonication times and enzymatic hydrolysis, where the optimal times were 15 minutes and 5 seconds for sonication and 128 minutes and 13 seconds for enzymatic hydrolysis. The test with the highest degree of hydrolysis was subjected to fractionation by means of ultrafiltration in a cutting membrane with a porosity of 3 kDa. the fraction containing peptides with molecular mass less than 3kDa was submitted to the evaluation of the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum microbicidal concentration (CMM) against the 9 reference bacterial strains. For the microorganism *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 the MIC and CMM values were set at 90 µg.mL⁻¹ and for the *Listeria monocytogenes* ATCC 19114, and *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 the MIC and CMM values were 1ug.mL⁻¹. For the strains *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enteritidis* ATCC 31194, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, and *Serratia marcescens* ATCC 13880 the values of MIC and CMM were defined as 90 ng.mL⁻¹. Demonstrating the great bactericidal potential of the peptide fraction prospecting from enzymatic hydrolysis of free range chicken egg white proteins previously submitted to sonication. Thus, the proposed proteolysis is efficient for the prospecting of bioactive peptides with antibacterial activity.

Keywords: antimicrobial peptides, egg white, protein hydrolysis, sonication, 40 kHz.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 Ovo de galinha	19
2.2 Modificação de estrutura proteica pela ação de ondas ultrassônicas	22
2.3 Peptídeos bioativos.....	25
2.3.1 Peptídeos antimicrobianos.....	29
3. OBJETIVOS.....	33
3.1 Objetivo geral.....	33
3.2 Objetivos específicos	33
4. MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 Obtenção da matéria-prima.....	34
4.2 Solubilização da clara do ovo caipira	34
4.3 Solução enzimática	34
4.4 Hidrólise proteica	35
4.4.1 Avaliação preliminar do grau de hidrólise	35
4.4.2 Otimização do grau de hidrólise.....	35
4.5 Validação do modelo estatístico de otimização.....	36
4.6 Grau de hidrólise.....	37
4.7 Fracionamento do hidrolisado proteico da clara do ovo caipira por meio de ultrafiltração em membrana de corte de 3kDa	37
4.8 Diluições seriadas dos peptídeos com massa molecular <3 kDa obtidos através da hidrólise enzimática da clara do ovo de galinha caipira.....	38
4.9 Amostras bacterianas	39
4.10 Teste de sensibilidade bacteriana.....	39
4.11 Concentração inibitória mínima (CIM).....	40
4.12 Concentração microbicida mínima (CMM)	41

4.13 Análises estatísticas.....	41
5. REFERÊNCIAS.....	41
CAPÍTULO I.....	46
Otimização dos parâmetros de hidrólise das proteínas da clara do ovo caipira para a produção de peptídeos antibacterianos	46
Resumo	47
RESUMO GRÁFICO	48
PRINCIPAIS ACHADOS.....	49
1. Introdução.....	50
2. Materiais e métodos.....	51
2.1 Reagentes e enzima	51
2.2 Obtenção dos ovos de galinha caipira e preparação da solução da clara do ovo	52
2.3 Preparação do hidrolisado proteico.....	52
2.3.1 Pré-seleção dos tempos de sonicação e hidrólise enzimática	52
2.3.2 Otimização do grau de hidrólise através da metodologia de superfície de resposta	53
2.4 Determinação do grau de hidrólise (GH).....	53
2.5 Fracionamento do hidrolisado proteico da clara do ovo caipira por ultrafiltração em membrana de corte de 3 kDa	54
2.6 Teste antibacteriano.....	54
2.6.1 Cepas bacterianas e condições de cultivo	54
2.6.2 Teste de sensibilidade bacteriana.....	54
2.6.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	55
2.6.4 Determinação da concentração microbicida mínima (CMM).....	56
2.7 Análises estatísticas.....	56
3. Resultados e discussões.....	56

3.1 Pré-seleção dos tempos de sonicação e hidrólise enzimática	56
3.2 Otimização do grau de hidrólise das proteínas da clara do ovo caipira .	58
3.3 Atividade antibacteriana	59
4. Conclusões	61
5. Referências	61
CONSIDERAÇÕES FINAIS	71

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 1.** Estruturas componentes do ovo 199
- Figura 2.** Modificação estrutural das proteínas a partir do processo de sonicação: Evolução do processo de cavitação e implosão das bolhas de ar em consequência da irradiação de ondas acústico mecânicas em alta frequência 244
- Figura 3.** Sítios de clivagem das endopeptidases e exopeptidases 277
- Figura 4.** Fluxograma da produção de peptídeos bioativos a partir da hidrólise enzimática de proteínas de origem animal ou vegetal submetidas ao pré-tratamento por ação de ondas ultrassônicas..... 288
- Figura 5.** Mecanismo de ação dos peptídeos antimicrobianos: Modelo barrel-stave (A); Modelo toroidal (B); Modelo carpet (C). A porção azul representa a fração hidrofóbica dos peptídeos, enquanto a porção vermelha hidrofílica.... 311

CAPÍTULO I

- Figura 1.** Gráfico de superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para o grau de hidrólise das proteínas da clara do ovo caipira em função dos tempos de sonicação e hidrólise enzimática.....70

LISTA DE QUADROS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Quadro 1. Principais proteínas presentes no albúmen do ovo, respectiva proporção, massa molecular e atividades biológicas 211

MATERIAL E MÉTODOS

Quadro 1. Cepas bacterianas utilizadas nos testes antibacterianos *in vitro*.. 399

LISTA DE TABELAS

MATERIAL E MÉTODOS

- Tabela 1.** Esquema de arranjo fatorial de tratamentos entre os tempos de sonicação e os tempos de hidrólise 355
- Tabela 2.** Valores reais e codificados para a otimização do grau de hidrólise das proteínas da clara do ovo caipira, empregados no Delineamento Composto Central Rotacionado..... 366
- Tabela 3.** Matriz de desenho experimental do Delineamento Central Composto Rotacionado com valores reais e codificados empregados na otimização do grau de hidrólise das proteínas da clara do ovo caipira 366
- Tabela 4.** Diluições seriadas dos peptídeos com massa molecular <3 kDa obtidos através da hidrólise enzimática da clara do ovo de galinha caipira ... 388

CAPÍTULO I

- Tabela 1.** Grau de hidrólise das proteínas da clara do ovo caipira pela ação da pancreatina comercial obtido através da interação entre diferentes tempos de sonicação e hidrólise enzimática.....65
- Tabela 2.** Matriz DCCR com valores reais e codificados para as variáveis dependentes e o percentual do grau de hidrólise das proteínas da clara do ovo de galinha caipira.....66
- Tabela 3.** ANOVA dos modelos de regressão para o grau de hidrólise das proteínas da clara do ovo caipira.....67
- Tabela 4.** Estimativa dos efeitos das variáveis para o grau de hidrólise das proteínas da clara do ovo caipira.....68
- Tabela 5.** Valores de concentração inibitória mínima e concentração microbicida mínima da fração peptídica com massa molecular <3 kDa prospectada a partir da hidrólise enzimática das proteínas da clara do ovo caipira.....69

1. INTRODUÇÃO

Proteínas alimentares são importantes constituintes dietéticos, pois fornecem peptídeos e aminoácidos necessários para a manutenção da vida dos organismos que as consomem. Além da função nutricional, essas macromoléculas são reconhecidas como fonte de substâncias naturais capazes de atuar na promoção e manutenção da saúde, assim como auxiliar na conservação de alimentos.

Os ovos de galinha são os produtos de origem animal mais estudados quanto a prospecção de substâncias bioativas, justificado pelo alto percentual proteico, baixo custo e a alta taxa de produção, especialmente aqueles produzidos por galinhas oriundas do sistema de criação em granjas. Entretanto, a crescente demanda por produtos que carregam o “selo verde” de origem, tem elevado o interesse dos consumidores em ovos de origem caipira, onde as aves são criadas soltas e apresentam livre acesso a alimentos naturais.

Além dos fatores supracitados, proteínas exclusivas foram encontradas em ovos provenientes de raças comumente criadas no sistema caipira, essa descoberta contribuiu com o redirecionamento dos focos de estudos de indústrias e centros de pesquisas para esses produtos, devido a possibilidade de prospecção de peptídeos com sequências de aminoácidos exclusivas.

Por definição, peptídeos são fragmentos proteicos que apresentam de dois a 30 aminoácidos interconectados por meio de ligações peptídicas. Muitos peptídeos são capazes de apresentar funções biológicas associadas, estes são denominados de peptídeos bioativos. Essas biomoléculas encontram-se inativas na conformação proteica e passam a exercer sua bioatividade após a liberação da cadeia proteica original.

Peptídeos são naturalmente produzidos através do processo de digestão química enzimática das proteínas, bem como por meio das reações metabólicas nos organismos multicelulares e unicelulares. Além disso, também são produzidos *in vitro*, através da maturação dos alimentos, processos fermentativos e mecanismos de hidrólise enzimática.

A hidrólise enzimática é o processo comumente empregado para a obtenção de peptídeos bioativos a partir das proteínas alimentares. Esse método gera

benefícios aos produtos finais, visto que é possível ter o controle adequado do processo através dos estudos que envolve parâmetros físicos e químicos da proteólise. Atualmente, ondas ultrassônicas têm sido aplicadas nos substratos alimentares com a finalidade de promover alterações estruturais, resultando na exposição de sítios catalíticos que antes eram inacessíveis, desta forma eleva-se a probabilidade de geração de peptídeos com sequências aminoacídicas exclusivas.

Os peptídeos bioativos são importantes biomoléculas naturais que apresentam grande potencial de aplicação e substituição aos diversos fármacos tradicionalmente comercializados. Esses produtos de origem natural são considerados seguros e possuem a capacidade de exercer mais de um efeito modulador. Estudos relatam diversas atividades associadas como ação antioxidante, anti-hipertensiva, antineoplásica, antiálgica, imunomoduladora, antimicrobiana, dentre outras.

Esses derivados proteicos podem ser importantes aliados no combate ao crescente número de cepas bacterianas multirresistentes, uma vez que apresentam um amplo espectro de ação antimicrobiano e baixos níveis de indução à resistência antimicrobiana.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

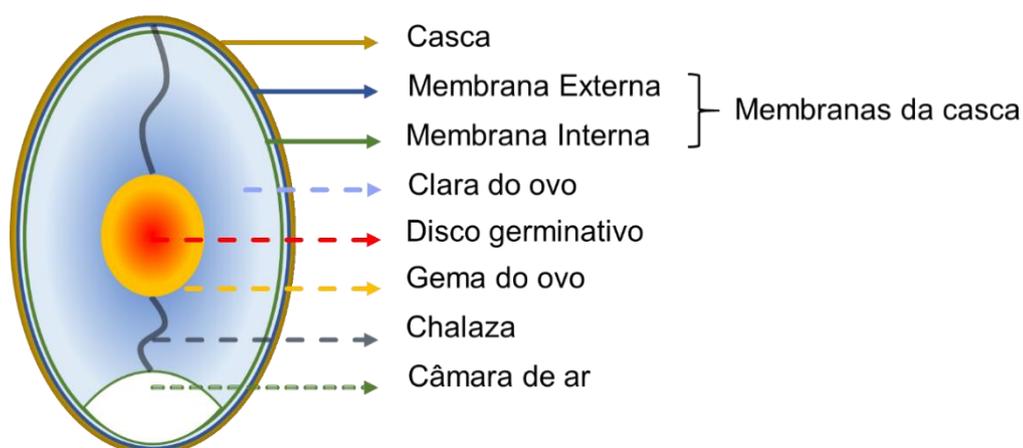
2.1 Ovo de galinha

O ovo de galinha é um produto de origem animal oriundo do metabolismo reprodutivo das aves, responsável por suscitar novos organismos e propagar a espécie. Apesar da ciência não comprovar o tempo exato do seu surgimento na terra, sabe-se que o ovo de galinha tem uma íntima relação com a evolução humana, há relatos da exploração deste produto em diferentes contextos culturais, desde a antiguidade até dias atuais, especialmente como constituinte dietético (ABEYRATHNE; AHN, 2015).

Do ponto de vista da indústria de alimentos, o ovo é definido, sem outra especificação, como ovo de galinha em casca. Esse produto pode ser comercializado em sua forma *in natura*, ou ainda sob a forma de produtos integrais ou fracionados processados industrialmente, de modo que suas características nutricionais, organolépticas e bioquímicas sejam preservadas, incluindo também a segurança microbiológica do produto (BRASIL, 2017).

Estruturas distintas fisicamente são encontradas de maneira comum nos ovos produzidos por todas as espécies capazes de gerar esse produto de origem animal (Figura 1) (SARCINELLI; VENTURINI; SILVA, 2007; FARKAS *et al.*, 2017).

Figura 1. Estruturas componentes do ovo



Fonte: O autor, (2019).

O ovo é um alimento com propriedades nutricionais elevadas, considerado completo, constituído por proteínas de alto valor biológico, vitaminas, fosfolipídios,

sais minerais e outras moléculas orgânicas. É fonte natural dos nove aminoácidos essenciais requeridos na dieta: fenilalanina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, treonina, triptofano e valina, que auxiliam na promoção da saúde humana (ARZENI; PÉREZ; PILOSOFF, 2012; SURAI, 2014; ZHOU *et al.*, 2016; LESNIEROWSKI; STANGIERSKI, 2018).

A clara do ovo é o constituinte em maior proporção no produto e representa cerca de dois terços do volume total do ovo sem casca. Macroscopicamente, é dividida em três frações: uma fração interna, com aspecto fluido e fino; uma intermediária, com característica espessa e densa; uma externa fluida e fina. Essas frações correspondem a aproximadamente 20%, 60% e 20% do volume total, respectivamente. A viscosidade e a densidade são geradas a partir das interações entre as diferentes proteínas que compõem o produto e o poder osmótico atribuído a cada uma delas (SEIBEL *et al.*, 2005).

No que diz respeito a composição química, a clara do ovo apresenta percentuais de água que variam entre 75% e 88%, para as proteínas esse valor gira em torno de 11% e 12%, incluindo também lipídios, carboidratos, sais minerais e outras moléculas em proporções menores. A composição e o percentual proteico podem sofrer leves variações a depender de fatores intrínsecos como a capacidade genética, idade e espécie, assim como fatores extrínsecos ligados a nutrição, manejo e estado sanitário das aves (YU *et al.*, 2011; GUIMARÃES *et al.*, 2017).

Até o ano de 1989, apenas 13 proteínas haviam sido identificadas, entretanto com o advento de equipamentos mais sofisticados associados a evolução dos métodos científicos para a realização da análise proteômica, destacando-se os métodos baseados em espectrometria de massa, foi possível a identificação de 70 proteínas (HIOKI *et al.*, 2014; ZHU *et al.*, 2018).

As principais proteínas encontradas na clara do ovo são ovoalbumina, ovotransferrina e ovomucóide, seguido pela ovomucina, lisozima, ovinibidor, cistatina e avidina em menores proporções (HE; YAN; FAN, 2014). Essas macromoléculas apresentam atividades biológicas associadas que favorecem o desenvolvimento embrionário, permeando desde funções imunomodulatórias até mesmo ações antimicrobianas de amplo espectro (Quadro 1) (ARZENI; PÉREZ; PILOSOFF, 2012; BHAT; KUMAR; BHAT, 2015).

Quadro 1. Principais proteínas presentes no albúmen do ovo, respectiva proporção, massa molecular e atividades biológicas

Proteína	Proporção (%)	Massa molecular (Daltons)	Atividades biológicas
Ovoalbumina	54 - 61,6	45 000	Imunomodulatória
Ovotransferrina	12 - 14,3	76 000	Imunomodulatória e antimicrobiana
Ovomucóide	11 - 12,6	28 000	Imunomodulatória e inibidora de proteases específicas
Ovomucina	3,5 - 4,0	210 000	Anticancerígena e antimicrobiana
Lisozima	3,4 - 3,9	14 300	Imunomodulatória, anticancerígena e antibacteriana
Ovoinibidor	1,7	49 000	Inibidora de proteases específicas
Cistatina	0,05	12 700	Inibidora de proteases específicas
Avidina	0,05 - 0,06	68 300	Antibacteriana

Fonte: Kovacs-Nolan; Phillips; Mine, (2005); Lesnierowski; Stangierski, (2018), adaptado.

As bioatividades das proteínas integrais limitam-se apenas a promoção e manutenção da saúde embrionária, quando o ovo é destinado ao consumo *in natura*, sem ser submetido ao tratamento térmico, algumas proteínas agem como fatores antinutricionais dificultando a ação de enzimas digestivas e absorção de nutrientes. A cocção das proteínas promove a desnaturação e resulta na eliminação dos fatores antinutricionais (SEIBEL *et al.*, 2005).

Além dos efeitos supracitados, alguns indivíduos desenvolvem processos alérgicos contra alguns constituintes do ovo, entretanto as características nutricionais positivas se destacam e reforçam o interesse de estudos científicos em empregar processos biotecnológicos com o objetivo de diminuir a alergenicidade do produto através da produção de derivados proteicos, além disso contribui para o aumento do valor agregado do produto (GRAY *et al.*, 2015).

Uma vasta quantidade de moléculas derivadas da proteína original pode ser explorada em aplicações farmacológicas e de interesse biomédico. É sabido que a principal fonte de ovos de galinhas comerciais destinados a produção de bioativos é oriunda de galinhas poedeiras submetidas ao sistema de criação em granja, também denominado de sistema de criação industrial (GUIMARÃES *et al.*, 2017).

Em contrapartida, o crescente interesse dos consumidores em adotar hábitos alimentares saudáveis, especialmente por produtos que carregam o “selo verde”, tem impulsionado o interesse das indústrias e centros de pesquisas em estudar novas fontes alimentares, como os ovos provenientes do sistema de criação caipira (SARCINELLI; VENTURINI; SILVA, 2007; JOANA GIL-CHÁVEZ *et al.*, 2013).

No modo de criação caipira, onde a galinha é criada solta no ambiente, gera benefícios as aves e aos seus produtos, pois além do respeito ao bem-estar animal proporcionado pelo método de criação, os ovos apresentam maiores teores de carotenoides totais e retinol, devido ao elevado consumo de forragens, além de não conter resíduos de antibióticos em sua constituição pelo fato das aves não receberem rações comerciais e aditivos na sua dieta (SARCINELLI; VENTURINI; SILVA, 2007).

Além disso, novas proteínas encontradas nos ovos do sistema de criação caipira têm impulsionado o interesse científico e mercadológico neste último produto, justificado pelo fato de que peptídeos bioativos com composições aminoacídicas exclusivas podem ser prospectados a partir dessas proteínas originais (HIOKI *et al.*, 2014; ZHU *et al.*, 2018).

2.2 Modificação de estrutura proteica pela ação de ondas ultrassônicas

A demanda populacional por alimentos de alta qualidade tem reforçado o interesse da ciência e tecnologia de alimentos no aprimoramento de técnicas já existentes e no desenvolvimento de novos processos tecnológicos. Esses avanços têm proporcionado a incorporação de procedimentos térmicos e não térmicos modernos nas indústrias, com o objetivo principal de garantir a conservação dos alimentos e a manutenção das características nutricionais e sensoriais (CHANDRAPALA *et al.*, 2012; DUJMIČ *et al.*, 2013; TAO; SUN, 2015; ZHOU *et al.*, 2016).

Pesquisas biotecnológicas encarregaram-se de explorar outros potenciais de aplicação desses procedimentos térmicos e não-térmicos, empregando-os como métodos de pré-tratamento de substrato alimentar, ou seja, métodos físicos ou químicos capazes de promover alterações na matriz estrutural dos alimentos sem que as características nutricionais e organolépticas sejam perdidas (CHANDRAPALA *et al.*, 2012). Essas modificações são fatores cruciais para a otimização de bioprocessos secundários ao pré-tratamento como a obtenção de substâncias bioativas derivadas dos alimentos com altos índices de teores proteicos (CHANDRAPALA *et al.*, 2012; CHU; WEI; ZHU, 2015).

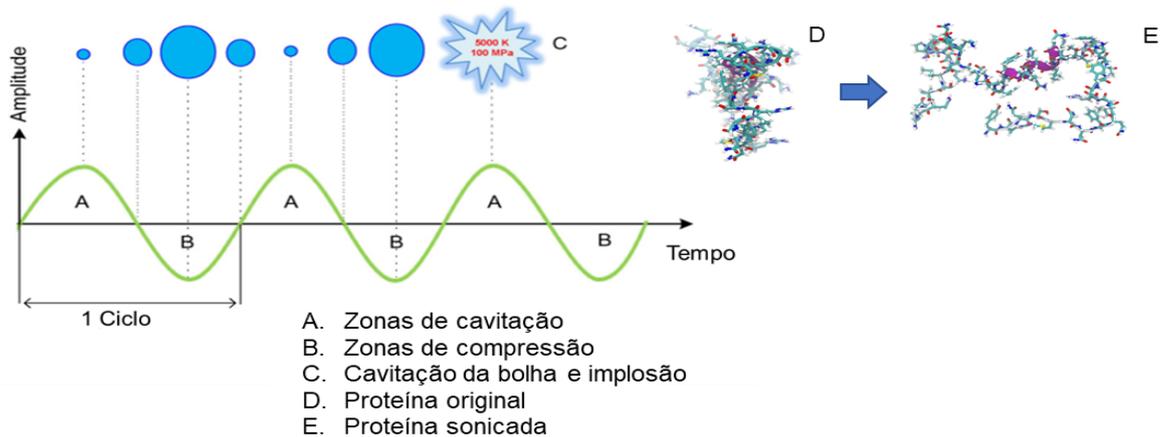
Os principais pré-tratamentos aplicados nos alimentos são o térmico, a pressão hidrostática e a sonicação por meio da ação de ondas ultrassônicas, sendo esse último o processo que mais desperta o interesse de aplicação, por conta dos benefícios resultantes como a possibilidade de aplicação em substratos sólidos, líquidos ou gasosos, assim como o baixo índice de perdas nutricionais associadas a desnaturação do alimento, especialmente quando comparado aos procedimentos que utilizam energia térmica (ARZENI; PÉREZ; PILOSOF, 2012; OZUNA *et al.*, 2015 JOVANOVIĆ *et al.*, 2016).

As ondas ultrassônicas são definidas como ondas mecânicas acústicas que oscilam numa frequência mínima de 20 kHz, são classificadas de acordo com a frequência considerada audível para o ouvido humano, como ondas de baixa frequência (abaixo de 20 Hz) ou de alta frequência (entre 20 e 100 kHz), também denominadas de infrassom ou ultrassom, respectivamente. As ondas ultrassônicas são comumente geradas a partir de equipamentos eletrônicos como sonicadores do tipo sonda, lavadoras ultrassônicas e aparelhos de ultrassom equipados com transdutores capazes de converter energia elétrica em energia sonora de alta frequência (CÁRCEL *et al.*, 2012).

A sonicação em meio líquido é a mais eficaz, pois as ondas ultrassônicas são capazes de se propagar com maior facilidade quando comparado com os outros estados físicos. A irradiação das ondas no meio produz um fenômeno físico conhecido como cavitação (Figura 2), onde as bolhas de gases dispersas no líquido aumentam gradativamente a pressão interna em decorrência da oscilação sonora, em determinado momento esse aumento nas dimensões das bolhas resulta em implosões

físicas que interagem com os componentes do substrato e promovem mudanças físicas (OZUNA *et al.*, 2015; JOVANOVIĆ *et al.*, 2016; ZHOU *et al.*, 2016).

Figura 2. Modificação estrutural das proteínas a partir do processo de sonicação: Evolução do processo de cavitação e implosão das bolhas de ar em consequência da irradiação de ondas acústico mecânicas em alta frequência



Fonte: Ozuna *et al.* (2015), adaptado.

A sonicação de alimentos com elevados teores de proteínas, como a clara do ovo, promove alterações conformacionais na cadeia proteica, tais medidas favorecem o emprego de bioprocessos secundários como a proteólise enzimática, visto que novos sítios de ação hidrolítica podem ser expostos e, conseqüentemente, frações peptídicas com diferentes tipos de resíduos de aminoácidos podem ser liberados da proteína original (LI *et al.*, 2012; CHU; WEI; ZHU, 2015).

Além disso, é importante ressaltar que a quebra das pontes de hidrogênio presente nas moléculas de água dispersas no meio auxiliam a modificação estrutural, esse mecanismo gera interações de carga elétrica entre as moléculas produzidas e o substrato, tornando-o mais ou até menos susceptível a ação hidrolítica das enzimas, a depender das condições e intensidade do pré-tratamento, do tempo de exposição a sonicação e da tipo de protease aplicada (ARZENI; PÉREZ; PILOSOF, 2012; ULUKO *et al.*, 2013).

2.3 Peptídeos bioativos

Os diferentes constituintes da dieta humana e animal são responsáveis pelo fornecimento de bioprodutos necessários para a manutenção da vida dos organismos que as consomem, dentre estes destacam-se as proteínas, elementos fundamentais para a obtenção de peptídeos e aminoácidos (TU *et al.*, 2018). Além do fator nutricional, muitos dos peptídeos gerados a partir da degradação proteica podem apresentar outras funções biológicas associadas e estes são denominados de peptídeos bioativos (LIAO *et al.*, 2018).

Os primeiros estudos relacionados a descoberta das funções bioativas dos peptídeos, datados de 1950, concentravam-se na utilização desses compostos para a ativação dos receptores do sabor umami, entretanto inúmeras pesquisas têm sido realizadas ao longo dos anos e muitas outras funcionalidades foram descobertas, permeando desde ações regulatórias das funções metabólicas nos organismos até mesmo aplicações industriais para a conservação de alimentos (CHAKRABARTI; JAHANDIDEH; WU, 2014).

Esses fragmentos proteicos apresentam de dois a 30 aminoácidos interconectados através de ligações peptídicas, diferenciando-se de acordo com a sequência e quantidade de aminoácidos, conferindo-lhes identidades e massas moleculares distintas (JOANA GIL-CHÁVEZ *et al.*, 2013; KADAM; SREEDHAR; CHANDRASEKHAR, 2015; AGEITOS *et al.*, 2017; CARRILLO; RAMOS, 2018). Fatores como o comprimento e massa da molécula, composição aminoacídica da cadeia, o resíduo de aminoácido presente na região C-terminal e N-terminal, os padrões de ionização da molécula, entre outros, influenciam diretamente as funções bioativas (LI *et al.*, 2012; UDENIGWE; ALUKO, 2012).

As principais bioatividades relatadas na literatura são relativas à ação antitrombótica, citomodulatória, reguladora dos níveis de colesterol, da glicemia, de processos oxidativos, da pressão arterial, ação antiviral, antifúngica e antibacteriana, propriedades antif formação e removedora de biofilmes bacterianos (LIAO *et al.*, 2018).

A produção desses fragmentos proteicos pode ocorrer tanto *in vivo* quanto *in vitro*. A digestão química enzimática das proteínas alimentares no sistema gastrointestinal é responsável pela produção natural de peptídeos, assim como as

atividades oriundas do metabolismo proteico inerente aos organismos multicelulares e unicelulares (ELZOGHBY; SAMY; ELGINDY, 2012; PARK; OKHOVAT; KIM, 2017).

No que se refere ao processo de digestão gastrointestinal como fonte de bioativos, a ação biológica final dos peptídeos torna-se pouco eficiente, uma vez que a molécula enfrenta desafios como inativação pela ação da microbiota local, hidrólise por proteases intestinais, baixa permeabilidade e seletividade da membrana intestinal, por conseguinte, atingindo discretos níveis de concentração sérica, além da rápida taxa de depuração renal que resulta na fácil eliminação da substância do organismo (GIANFRANCESCHI *et al.*, 2018).

Diante dos desafios enfrentados *in vivo*, pesquisadores têm se concentrado na obtenção através de métodos *in vitro* como a prospecção por meio da maturação de alimentos, fermentação microbiana ou hidrólise por enzimas específicas, associando-os a tecnologias da química medicinal e da farmacotécnica que conferem estabilidade ao fragmento proteico, torna-os viáveis para o desenvolvimento e aplicação em produtos comercializáveis (ELZOGHBY; SAMY; ELGINDY, 2012; NIKOLAEV *et al.*, 2016; ACQUAH *et al.*, 2019).

Dentre os métodos *in vitro*, a hidrólise enzimática é o mais empregado, pois carrega inúmeras vantagens, visto que permite estudos mais aprofundados sobre ajustes na relação enzima/substrato, tempo de catálise, entre outros, que pode resultar no máximo de rendimento e consequente aumento do percentual de obtenção dos compostos resultantes (LI *et al.*, 2012; KETNAWA *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2016).

Essas biomoléculas são amplamente produzidas e recuperadas a partir de diferentes proteínas de origem vegetal e animal, entretanto o ovo, em especial o de galinha, é apontado como um dos principais produtos empregados na geração de peptídeos de interesse farmacêutico, alimentício e biotecnológico, devido ao seu elevado teor proteico e facilidade de recuperação dos produtos de interesse (CHAKRABARTI; JAHANDIDEH; WU, 2014; TOLDRÁ *et al.*, 2018; TU *et al.*, 2018).

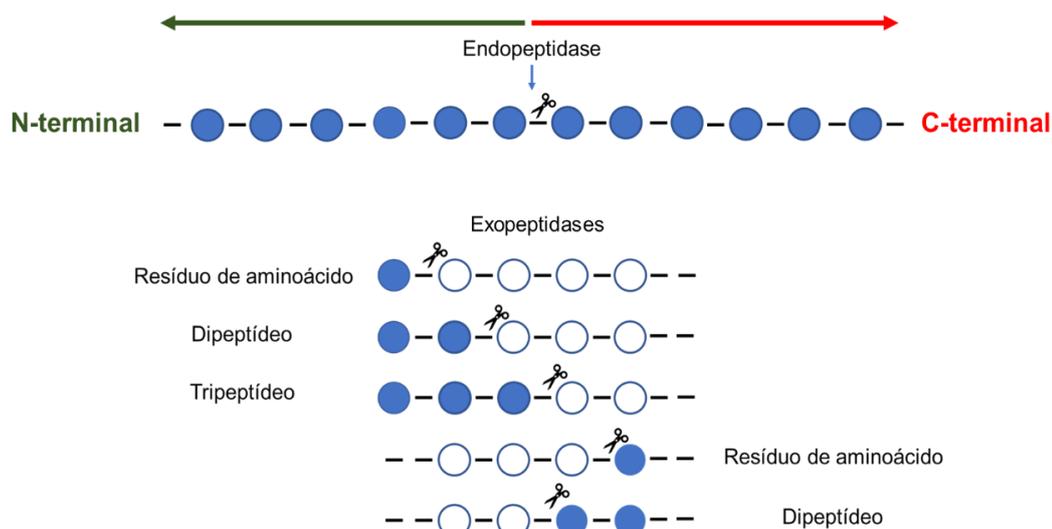
Enzimas proteolíticas comumente denominadas de proteases ou peptidases, são moléculas orgânicas pertencentes a classe das hidrolases. Esses catalisadores são especializados em reações bioquímicas de fragmentação das proteínas através da clivagem das ligações peptídicas existentes na cadeia proteica por meio da adição

de uma molécula de água na estrutura e consequente liberação de peptídeos e resíduos de aminoácidos (MARATHE *et al.*, 2019).

As proteases podem ser divididas em endopeptidases e exopeptidases baseado no local onde ocorre a ação hidrolítica. As endopeptidases são responsáveis por clivar as ligações peptídicas internas das proteínas, ocasionando a liberação de peptídeos que apresentam de dois até 50 resíduos de aminoácidos em sua composição (GIANOTTI, 2008; UDENIGWE; ALUKO, 2012; ROMANOVA; SWEEDLER, 2015).

As exopeptidases compõem a segunda subclasse e atuam clivando ligações peptídicas próximas as extremidades N ou C terminais das cadeias polipeptídicas; quando ação hidrolítica ocorre na extremidade N-terminal da cadeia proteica pode ocorrer a liberação de um resíduo de aminoácido, dipeptídeos ou tripeptídeos, por outro lado quando a ação ocorre na extremidade C-terminal é possível haver a liberação de um resíduo de aminoácido ou dipeptídeos (Figura 3) (TAVANO, 2013; THERON; DIVOL, 2014).

Figura 3. Sítios de clivagem das endopeptidases e exopeptidases



Fonte: Gianotti (2008), adaptado.

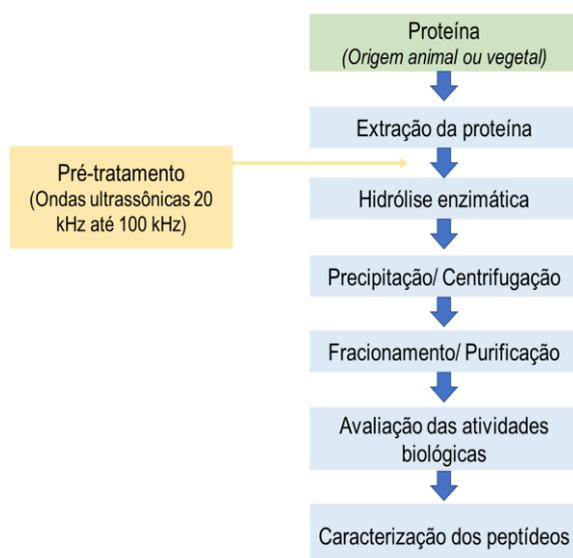
A enorme possibilidade combinatória na sequência dos resíduos de aminoácidos da cadeia peptídica gerada através da ação das endopeptidases faz com que sua aplicação em processos biotecnológicos tenha grande relevância, uma vez que fatores intrínsecos dos peptídeos como o tamanho, massa, carga elétrica e ponto

isoelétrico influenciam a sua bioatividade (JOANA GIL-CHÁVEZ *et al.*, 2013; THERON; DIVOL, 2014).

Nesse sentido, a utilização da pancreatina comercial oriunda do pâncreas suíno, constituída pelo complexo enzimático de serino-endopeptidases (tripsina e quimotripsina), metalo-exopeptidases (carboxipeptidase A e carboxipeptidase B), lipases, amilases e ribonucleases é uma importante ferramenta para a prospecção de peptídeos, especialmente por apresentar endopeptidases e exopeptidases em sua composição (CARREIRA *et al.*, 2009).

Estudos recentes têm aplicado processos de pré-tratamento da matriz alimentar, com a finalidade de otimizar o processo de hidrólise e aumentar a probabilidade de geração de compostos exclusivos. Dentre as fontes proteicas utilizadas, destacam-se a proteína isolada de aveia (CHEN *et al.*, 2011; WANG; LI; WANG, 2016); clara de ovo (LI *et al.*, 2012; STEFANOVIĆ *et al.*, 2014; JOVANOVIĆ *et al.*, 2016); proteínas da membrana da casca do ovo (JAIN; ANAL, 2016), dentre outros, e os resultados obtidos comprovam a eficácia do método. A Figura 4 demonstra o fluxograma de obtenção de peptídeos bioativos, através da associação entre o pré-tratamento da fonte proteica e a hidrólise enzimática.

Figura 4. Fluxograma da produção de peptídeos bioativos a partir da hidrólise enzimática de proteínas de origem animal ou vegetal submetidas ao pré-tratamento por ação de ondas ultrassônicas



Fonte: OZUNA *et al.*, (2015), adaptado.

2.3.1 Peptídeos antimicrobianos

Nas últimas décadas o crescente número de cepas bacterianas multirresistentes aos fármacos antimicrobianos, tradicionalmente comercializados, tem gerado grandes preocupações acerca da saúde global. A resistência expressa pelos agentes bacterianos é consequência do uso indiscriminado e irracional dos fármacos destinados a esse fim terapêutico, e desta forma, a prática incorreta favorece a seleção de cepas que apresentam mecanismos genéticos capazes de driblar a ação dos medicamentos bactericidas ou bacteriostáticos sobre a célula microbiana, resultando na perda da eficácia medicamentosa (SILA *et al.*, 2014).

Esse problema tem redirecionado o foco de pesquisas científicas para a descoberta de novas classes terapêuticas, devido a urgência no combate a esses agentes. Estudos ligados a prospecção de novas substâncias antimicrobianas, apontam os peptídeos com ação antimicrobiana de amplo espectro como substâncias bioativas de origem natural com alto potencial de aplicação terapêutica contra tais agentes patogênicos (TANG *et al.*, 2015; ZHARKOVA *et al.*, 2019).

Peptídeos antimicrobianos (PAMs) constituem a primeira barreira de defesa dos organismos, são naturalmente produzidos pelas células de defesa do sistema imunológico, assim como também são gerados no trato digestivo através da degradação química enzimática das proteínas e por meio do metabolismo de organismos unicelulares (WANG; LI; WANG, 2016; BEN LAGHA *et al.*, 2017; PARK; OKHOVAT; KIM, 2017).

Centros de pesquisas são responsáveis por estudar e alimentar bancos de dados relacionados a caracterização bioquímica dos peptídeos. Atualmente, há dados referentes a mais de 5000 tipos de peptídeos antimicrobianos, a maioria destes são descritos como moléculas catiônicas que apresentam de 2⁺ a 9⁺ elétrons disponíveis para interações eletroquímicas, estruturas hidrofílicas e hidrofóbicas que conferem características anfipáticas, conformação alfa-helicoidal, geralmente compostos de 12-37 resíduos de aminoácidos, sendo o maior já identificado com 100 resíduos (WANG; LI; WANG, 2016; JIA *et al.*, 2019).

A característica eletrostática catiônica e a estrutura anfipática colaboram para que os peptídeos antimicrobianos auxiliem o sistema imune ligando-se aos fosfolípidios e ácidos lipotécóicos das membranas celulares bacterianas, carregados

negativamente. Essa ação, comum aos PAMs, permite a divisão em duas classes: PAMs disruptivos e não-disruptivos de membrana celular microbiana; a primeira classe promove a ruptura da membrana e a segunda baseia-se na interação com os componentes internos da célula microbiana, podendo ainda interagir com a membrana lipídica sem promover a ruptura (GIULIANI; PIRRI; NICOLETTO, 2007; BAHAR; DANCHENG, 2013; AGEITOS *et al.*, 2017).

Os estudos baseados com a classe dos PAMs disruptivos se aprofundaram ao longo dos anos, modelos científicos foram propostos com o objetivo de explicar o mecanismo de ação desses fragmentos proteicos biologicamente ativos. Destacando-se os modelos *barrel-stave*, *carpet* e *toroidal* (Figura 5) como os mais citados na literatura (BROGDEN, 2005; TRAVKOVA; MOEHWALD; BREZESINSKI, 2017).

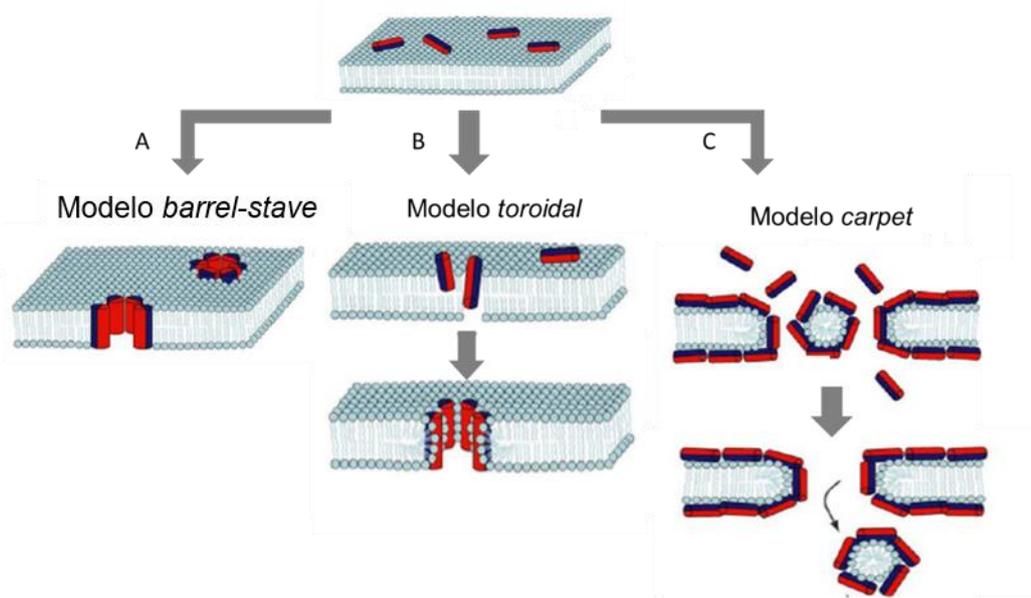
No modelo *barrel-stave* (Figura 5A) os peptídeos se aderem aos fosfolipídeos e ácidos lipoteicóicos presentes nas membranas das bactérias gram-negativas e gram-positivas, respectivamente, penetram a membrana plasmática das bactérias e promovem a formação de um conduto central semelhante a um barril, em consequência do alinhamento entre os peptídeos e os núcleos polares e apolares da bicamada lipídica, esse mecanismo de ação resulta no direcionamento do seguimento hidrofílico para o interior do lúmen (BROGDEN, 2005; TRAVKOVA; MOEHWALD; BREZESINSKI, 2017).

O mecanismo de ação do modelo *toroidal* (Figura 5B) é muito semelhante ao relatado no modelo *barrel-stave*, há também a formação de poros na membrana, entretanto a interação da porção hidrofóbica dos peptídeos ocorre apenas com as porções lipídicas apolares da membrana, induzido de forma contínua a formação de dobras ao longo das monocamadas de lipídios através dos poros, mecanismo que resulta em núcleos aquosos revestidos pelos peptídeos inseridos e pelas cabeças de peptídeos também (BROGDEN, 2005; TRAVKOVA; MOEHWALD; BREZESINSKI, 2017).

No modelo *carpet* (Figura 5C) os peptídeos antimicrobianos aderem-se a bicamada lipídica das bactérias e promovem a desintegração da estrutura por meio da interação com as porções hidrofóbicas e consequente produção de micelas, mecanismo semelhante ao modo de ação de um detergente (BROGDEN, 2005; LOHNER, 2017; TRAVKOVA; MOEHWALD; BREZESINSKI, 2017).

A eficiência dessas moléculas bioativas como substâncias bactericidas de amplo espectro é comprovada, e apesar do mecanismo de ação principal ser relatado como as interações com a membrana celular bacteriana, outros mecanismos menos explorados também são reconhecidos como a inibição da síntese dos ácidos nucléicos, alterações na síntese das proteínas microbianas, ligação com o ATP, favorecimento da formação de espécies reativas de oxigênio no interior microbiano e inibição enzimática (NAWROT *et al.*, 2014; JIA *et al.*, 2019).

Figura 5. Mecanismo de ação dos peptídeos antimicrobianos: Modelo barrel-stave (A); Modelo toroidal (B); Modelo carpet (C). A porção azul representa a fração hidrofóbica dos peptídeos, enquanto a porção vermelha representa a porção hidrofílica



Fonte: Travkova; Moehwald; Brezesinski (2017), adaptado.

Apesar do grande número de peptídeos antimicrobianos identificados, um dos grandes desafios enfrentados no meio científico para a produção de tais moléculas é a toxicidade celular, posto que esses biocompostos podem interagir com os componentes da membrana celular do hospedeiro e ocasionar efeitos deletérios ao organismo. Diante disso, estudos *in vitro* têm se concentrado na prospecção de peptídeos sintéticos com baixa ação citotóxica (PFALZGRAFF; BRANDENBURG; WEINDL, 2018).

Dito isto, essas biomoléculas de origem alimentar possuem a capacidade de agir de maneira similar as drogas sintéticas e podem ser usadas de forma potencial em terapêuticas antimicrobianas. É de suma importância a ampliação de pesquisas

que tenham como propósito utilizar as propriedades funcionais dos biopeptídeos na prevenção e no tratamento dos mais diversos tipos de doenças, bem como em processos de conservação de alimentos (SAADI *et al.*, 2015).

3. OBJETIVOS

3.1 *Objetivo geral*

Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* de peptídeos oriundos da hidrólise enzimática de proteínas da clara do ovo caipira previamente submetidas à modificação estrutural através da ação ultrassônica.

3.2 *Objetivos específicos*

- Estabelecer condições ótimas entre os tempos de sonicação e de proteólise enzimática empregando modelos estatísticos experimentais para a hidrólise das proteínas da clara do ovo caipira;
- Obter peptídeos com massa molecular <3 kDa a partir do hidrolisado proteico;
- Avaliar a sensibilidade antibacteriana *in vitro* aos peptídeos com massa molecular <3 kDa;
- Avaliar a concentração inibitória mínima de crescimento bacteriano *in vitro* de peptídeos com massa molecular <3 kDa.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção da matéria-prima

Os ovos de galinha foram gentilmente cedidos por diferentes produtores locais da zona rural da cidade de Garanhuns, localizada na região do agreste meridional do estado de Pernambuco (**Latitude:** -8.89074, **Longitude:** -36.4966). A coleta foi realizada imediatamente após a postura, em seguida, os ovos foram higienizados com solução antisséptica (clorexidina 2%) e armazenados em caixas térmicas sob refrigeração, por conseguinte, transportados até o Laboratório de Microbiologia, Tecnologia Enzimática e Bioprodutos da Universidade Federal do Agreste de Pernambuco para a realização das análises subsequentes.

4.2 Solubilização da clara do ovo caipira

Em laboratório, os ovos foram lavados com álcool etílico 70° INPM e manipulados em capela de fluxo laminar, previamente higienizada e esterilizada, com a finalidade de diminuir a contaminação microbiana da matéria prima. A casca foi quebrada manualmente e a clara foi separada da gema. Em seguida, 135 mL da clara do ovo caipira foram solubilizados em 865 mL de tampão fosfato salino (pH 8,0 e 0,05 M), com o substrato proteico correspondendo a 13,5% (v/v) do volume total após a solubilização o material foi congelado e mantido a -20 °C para análises posteriores.

4.3 Solução enzimática

O complexo enzimático pancreatina comercial (EC 3.4.21.4) (Sigma Aldrich®) foi empregado no processo de hidrólise das proteínas da clara do ovo caipira. A ação hidrolítica de todos os ensaios transcorreu sob as condições ótimas para ação enzimática (55 °C e pH 8,0), especificadas pelo fabricante. Os ensaios foram conduzidos em frascos tipo Erlenmeyer com capacidade de 250 mL, contendo 50 mL de substrato proteico na proporção de 1:50 (v/v) enzima:substrato, cada ensaio apresentou uma concentração enzimática de 150 U.mL⁻¹.

4.4 Hidrólise proteica

4.4.1 Avaliação preliminar do grau de hidrólise

Todos os ensaios contendo o substrato proteico foram submetidos ao pré-tratamento de sonicação em lavadora de banho ultrassônico (USC 1600, Unique, São Paulo), numa frequência de 40 kHz, com a finalidade de promover alterações estruturais nas proteínas da clara do ovo caipira. Em seguida, foram submetidos à hidrólise enzimática por ação da pancreatina comercial. O delineamento experimental aplicado para a avaliação preliminar do grau de hidrólise das proteínas da clara do ovo caipira em decorrência das interações entre diferentes tempos de sonicação ultrassônica e hidrólise enzimática foi baseado em um esquema de arranjo fatorial de tratamentos, constituído por uma enzima, quatro tempos de sonicação e quatro tempos de hidrólise enzimática (1x4x4) apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Esquema de arranjo fatorial de tratamentos entre os tempos de sonicação e os tempos de hidrólise

Enzima	Tempo de sonicação (min)	Tempo de hidrólise (min)			
Pancreatina comercial	0	0	60	120	240
	15	0	60	120	240
	30	0	60	120	240
	60	0	60	120	240

4.4.2 Otimização do grau de hidrólise

O Delineamento Composto Central Rotacionado foi aplicado com a finalidade de encontrar, por meio de inferências estatísticas, os tempos ótimos de sonicação e hidrólise enzimática, com o intuito de alcançar o nível máximo do grau de hidrólise, em percentual, das proteínas da clara do ovo caipira. A matriz de delineamento foi desenhada a partir de cinco níveis (-1,44 -1, 0, +1 e +1,44) para cada variável independente, os pontos centrais para cada variável foram escolhidos com base na combinação entre o tempo de sonicação e o tempo de hidrólise que apresentaram maior grau de hidrólise no arranjo fatorial de tratamentos, os níveis (-1 e +1) e os pontos axiais (-1,44 e +1,44) foram gerados por meio do software *Statistic 10*, baseados nos valores dos pontos centrais. A Tabela 2 representa os valores reais e

codificados empregados no Delineamento Composto Central Rotacionado, enquanto a Tabela 3 representa a matriz de delineamento experimental com os valores reais e codificados, constituída por 12 ensaios, onde os três últimos são repetições dos pontos centrais.

Tabela 2. Valores reais e codificados para a otimização do grau de hidrólise das proteínas da clara do ovo caipira, empregados no Delineamento Composto Central Rotacionado

Variáveis independentes	Unidade	Níveis				
		-1,44	-1	0	+1	+1,44
Tempo de sonicação	Minutos	4min39s	7min30s	15min	22min30s	26min1s
Tempo de hidrólise	Minutos	35min14s	60min	120min	180min	205min5s

Tabela 3. Matriz de desenho experimental do Delineamento Central Composto Rotacionado com valores reais e codificados empregados na otimização do grau de hidrólise das proteínas da clara do ovo caipira

Ensaio	Tempo de Sonicação	Tempo de Hidrólise
1	7min30s (-1)	60min (-1)
2	7min30s (-1)	180min (+1)
3	22min30s (+1)	60min (-1)
4	22min30s (+1)	180min (+1)
5	4min39s (-1,44)	120min (0)
6	26min01s (+1,44)	120min (0)
7	15min00s (0)	35min14s (-1,44)
8	15min00s (0)	205min5s (+1,44)
9	15min00s (0)	120min (0)
11	15min00s (0)	120min (0)
12	15min00s (0)	120min (0)

4.5 Validação do modelo estatístico de otimização

Objetivando-se validar as condições ideais previstas pelo planejamento estatístico de otimização, foram realizados três ensaios adicionais com os valores ótimos para as variáveis independentes tempo de sonicação e tempo de hidrólise, preditos pelo planejamento estatístico.

4.6 Grau de hidrólise

O grau de hidrólise (GH) dos ensaios foi determinado pelo método de Nalinanon *et al.*, (2011). Esse definiu como a razão percentual do número de ligações peptídicas quebradas para o número total de ligações por unidade de peso. Grupos amino livres obtidos da reação de hidrólise foram mensurados por ácido trinitrobenzenossulfônico (TNBS), uma alíquota de 150 µL de amostra foi adicionada a 2,0 mL de tampão fosfato 0,2 M (pH 8,2) e 1,0 mL de solução de 0,1% TNBS, seguido de incubação em banho-maria a 50 °C por 30 minutos no escuro. A reação foi interrompida pela adição de 2,0 mL de sulfito de sódio a 0,1 M. Após 15 minutos, a absorbância foi medida a 420 nm e o α-aminoácido foi expresso em termos de L-leucina. Os números totais de grupos amino foram determinados em HCl 6 M a 100 °C durante 24 horas. O grau de hidrólise foi calculado de acordo com a equação 1:

$$GH(\%) = \left(\frac{L_t - L_0}{L_{Max} - L_0} \right) * 100 \quad \text{Eq. 1}$$

Onde L_t é a quantidade de α-aminoácido liberada no tempo t , L_0 é a quantidade de α-aminoácido no substrato original de proteína solubilizada em ácido e L_{Max} é o número total de grupos amino.

4.7 Fracionamento do hidrolisado proteico da clara do ovo caipira por meio de ultrafiltração em membrana de corte de 3kDa

O fracionamento do hidrolisado foi realizado com o intuito de avaliar a atividade antibacteriana atribuída apenas aos peptídeos com massa molecular <3 kDa obtidos a partir da hidrólise das proteínas precursoras. O processo de separação foi realizado por meio de ultrafiltração com membrana de corte com microporosidade de 3 kDa, Amicon® Ultra-15 (Milipore Ireland Ltd, Tullagreen, Irlanda), centrifugados a 4000 x g, durante 40 minutos a 4 °C. O material permeado foi congelado a -20 °C.

4.8 Diluições seriadas dos peptídeos com massa molecular <3 kDa obtidos através da hidrólise enzimática da clara do ovo de galinha caipira

O material liofilizado foi descongelado, pesado em balança analítica e ressuspendido em água ultrapura numa concentração inicial de 100 mg.mL⁻¹. A amostra ressuspendida foi submetida a diluição seriada, onde foram preparadas 20 amostras em diferentes concentrações, conforme a Tabela 4. Em seguida, as diluições foram congeladas e armazenadas a -20 °C para posteriores análises.

Tabela 4. Diluições seriadas dos peptídeos com massa molecular <3 kDa obtidos através da hidrólise enzimática da clara do ovo de galinha caipira

Amostra	Concentração
	Miligramas por mililitro (mg.mL ⁻¹)
solução-mãe	100
1	50
2	25
3	12,5
4	6,25
5	3,125
6	1,5625
7	0,78125
8	0,39062
9	0,19531
10	0,09656
11	0,04882
12	0,02441
13	0,01220
14	0,00610
15	0,00305
16	0,00152
17	0,00076
18	0,00038
19	0,00019
20	0,00009

4.9 Amostras bacterianas

No presente estudo, foram utilizadas nove cepas bacterianas de referência, provenientes da American Type Culture Collection, onde cinco são classificadas como Gram-positivas e cinco como Gram-negativas, conforme o Quadro 1.

Quadro 1. Cepas bacterianas de referência ATCC utilizadas nos testes antibacterianos *in vitro*

N	Cepa bacteriana	Origem	Classificação Gram
1	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 11778	Positiva
2	<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	Positiva
3	<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19114	Positiva
4	<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19117	Positiva
5	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739	Negativa
6	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	Negativa
7	<i>Salmonella enteritidis</i>	ATCC 31194	Negativa
8	<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 14028	Negativa
9	<i>Serratia marcescens</i>	ATCC 13880	Negativa

4.10 Teste de sensibilidade bacteriana

O teste de sensibilidade bacteriana aos peptídeos com massa molecular <3 kDa foi determinado pelo método de inibição do crescimento bacteriano, através da turbidez em microplaca, descrito pela norma instituída pela *Clinical & Laboratory Standards Institute - CLSI* (NCCLS, 2003). Inicialmente, as nove cepas de bactérias foram cultivadas em caldo Mueller-Hinton por 12 horas a 37 °C. Os ensaios foram compostos por 100 µL da amostra peptídica ultrafiltrada numa concentração de 100 mg.mL⁻¹, 90 µL de caldo Mueller-Hilton e 10 µL de suspensão bacteriana, previamente submetidas a uma leitura de absorbância a 600 nm em espectrofotômetro para a padronização do inóculo microbiano em 10⁸ UFC.mL⁻¹, correspondente ao valor 0,5 da escala de McFarland. O controle negativo foi composto por 100 µL de água estéril no lugar da fração peptídica <3 kDa, testado sob as mesmas condições experimentais. Todos os ensaios foram realizados em microplacas de 96 poços de poliestireno, fundo plano, estéreis e conduzidos em triplicatas. A atividade de sensibilidade bacteriana foi expressa em porcentagem de inibição de crescimento e calculada através da Equação 2:

$$Inibição\ bacteriana\ (\%) = \left(\frac{A_{controle} - A_{amostra}}{A_{controle}} \right) \times 100 \quad \text{Eq. 2}$$

Onde, $A_{controle}$ corresponde a densidade ótica do controle positivo para o crescimento e $A_{amostra}$ corresponde a densidade ótica da cepa bacteriana, submetidas a uma leitura de absorvância de 600 nm em leitora de microplacas.

4.11 Concentração inibitória mínima (CIM)

O teste de concentração inibitória mínima dos peptídeos com massa molecular <3 kDa frente as nove cepas bacterianas foi determinado pelo método de inibição do crescimento bacteriano, através da turbidez em microplaca, descrito pela norma instituída pela *Clinical & Laboratory Standards Institute - CLSI* (NCCLS, 2003). Inicialmente, as nove cepas de bactérias foram cultivadas em caldo Mueller-Hinton por 12 horas a 37 °C. Os ensaios foram compostos por 100 µL da amostra ultrafiltrada nas respectivas concentrações a serem testadas, 90 µL de caldo Mueller-Hilton e 10 µL de suspensão bacteriana previamente submetidas a uma leitura de absorvância de 600 nm em espectrofotômetro para a padronização do inóculo microbiano em 10⁸ UFC.mL⁻¹, correspondente ao valor 0,5 da escala de McFarland. O controle negativo foi composto por 100 µL de água estéril no lugar da fração peptídica <3 kDa, testado sob as mesmas condições experimentais. Todos os ensaios foram realizados em microplacas de 96 poços de poliestireno, fundo plano, estéreis e conduzidos em triplicatas. A atividade antibacteriana foi expressa em porcentagem de CIM (%) e calculada através da equação 3:

$$CIM\ (\%) = \left(\frac{A_{controle} - A_{amostra}}{A_{controle}} \right) \times 100 \quad \text{Eq. 3}$$

Onde, $A_{controle}$ corresponde a densidade ótica do controle positivo para o crescimento e $A_{amostra}$ corresponde a densidade ótica da cepa bacteriana, submetidas a uma leitura de absorvância de 600 nm em leitora de microplacas.

4.12 Concentração microbicida mínima (CMM)

O teste de concentração microbicida mínima foi realizado de acordo com a metodologia instituída pela norma *Clinical & Laboratory Standards Institute - CLSI* (NCCLS, 2003), onde 100 µL dos ensaios finais utilizados no teste de CIM foram pipetados em ágar *Mueller Hinton* e analisados quanto a presença ou ausência do crescimento microbiano com a finalidade de identificar a concentração mínima necessária para promover a morte celular microbiana.

4.13 Análises estatísticas

Todos os experimentos no presente trabalho foram conduzidos em triplicata. As diferenças significativas ($p < 0,05$) foram identificadas pelo método de comparação de médias de *Tukey* por meio dos softwares estatísticos *SISVAR 5.7* (FERREIRA, 2014) e *Statistic 10*.

5. REFERÊNCIAS

- ABEYRATHNE, E. D. N. S.; AHN, D. U. Isolation of value-added components from egg white and their potential uses in food, nutraceutical and pharmaceutical industries. In R. R. Watson, & F. de Meester (Eds.). **Handbook of eggs in human function**, (p. 35-52). Wageningen The Netherlands: Wageningen Academic Publishers, 2015.
- ABDEL-HAMID, M. *et al.* Antibacterial activity of papain hydrolysed camel whey and its fractions. **International Dairy Journal**, v. 61, p. 91–98, 2016.
- ACQUAH, C. *et al.* Structure-informed separation of bioactive peptides. **Journal of Food Biochemistry**, v. 43, p. 1–10, 2019.
- AGEITOS, J. M. *et al.* Antimicrobial peptides (AMPs): Ancient compounds that represent novel weapons in the fight against bacteria. **Biochemical Pharmacology**, v. 133, p. 117–138, 2017.
- ARZENI, C.; PÉREZ, O. E.; PILOSOFF, A. M. R. Functionality of egg white proteins as affected by high intensity ultrasound. **Food Hydrocolloids**, v. 29, n. 2, p. 308–316, 2012.
- BAHAR, A. A.; DANCHENG, R. Antimicrobial peptides. **Surgical Infections**, v. 19, n. 8, p. 804–811, 2013.
- LAGHA, A. B. *et al.* Antimicrobial potential of bacteriocins in poultry and swine production. **Veterinary Research**, v. 48, n. 1, p. 1–12, 2017.
- BHAT, Z. F.; KUMAR, S.; BHAT, H. F. Bioactive peptides of animal origin: a review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 9, p. 5377–5392, 2015.
- BRASIL. REGULAMENTO inspeção industrial e sanitária de produtos de origem

- animal. **DECRETO Nº9.013 de 29 de março de 2017**, v. 9013, p. 1–108, 2017.
- BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 238–250, 2005.
- CÁRCEL, J. A. *et al.* Food process innovation through new technologies: Use of ultrasound. **Journal of Food Engineering**, v. 110, n. 2, p. 200–207, 2012.
- CARREIRA, R. L. *et al.* Ação de fatores enzimáticos na obtenção de hidrolisados protéicos de farinha de trigo com baixo teor de fenilalanina. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 1, p. 93–98, 2009.
- CHAKRABARTI, S.; JAHANDIDEH, F.; WU, J. Food-derived bioactive peptides on inflammation and oxidative stress. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.
- CHANDRAPALA, J. *et al.* Ultrasonics in food processing. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 19, n. 5, p. 975–983, 2012.
- CHEN, L. *et al.* Effects of ultrasound pretreatment on the enzymatic hydrolysis of soy protein isolates and on the emulsifying properties of hydrolysates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 6, p. 2600–2609, 2011.
- CHU, H. J.; WEI, H. L.; ZHU, J. Ultrasound enhanced radical graft polymerization of starch and butyl acrylate. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 90, p. 1–5, 2015.
- DUJMIČ, F. *et al.* Ultrasound-assisted infrared drying of pear slices: Textural issues. **Journal of Food Process Engineering**, v. 36, n. 3, p. 397–406, 2013.
- ELZOGHBY, A. O.; SAMY, W. M.; ELGINDY, N. A. Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 157, n. 2, p. 168–182, 2012.
- FARKAS, A. *et al.* Comparative analysis of the bacterial membrane disruption effect of two natural plant antimicrobial peptides. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 51, p. 1–12, 2017.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 38, n. 2, p. 109–112, 2014.
- GIANFRANCESCHI, G. L. *et al.* Biochemical requirements of bioactive peptides for nutraceutical efficacy. **Journal of Functional Foods**, v. 47, p. 252–263, 2018.
- GIANOTTI, A. “Produção recombinante e estudos funcionais de três novas cistatinas da cana-de-açúcar e sua utilização em estudos de inibição da adesão, proliferação, migração e invasão celular”. p. 138, 2008.
- GIULIANI, A.; PIRRI, G.; NICOLETTO, S. F. Antimicrobial peptides: An overview of a promising class of therapeutics. **Central European Journal of Biology**. v. 2, n. 1, p. 1-33, 2007.
- GRAY, C. L. *et al.* Epidemiology of IgE-mediated food allergy. **South African Medical Journal**, v. 105, n. 1, p. 68–69, 2015.
- GUIMARÃES, D. *et al.* Avicultura de postura: estrutura da cadeia produtiva, panorama do setor no Brasil e no mundo e o apoio do BNDES. **Agroindústria**, v. 45, p. 85–136, 2017.
- HE, J.; YAN, H.; FAN, C. Optimization of ultrasound-assisted extraction of protein from

egg white using response surface methodology (RSM) and its proteomic study by MALDI-TOF-MS. **RSC Advances**, v. 4, n. 80, p. 42608–42616, 2014.

HIOKI, Y. et al. Nano-LC/MALDI-MS using a column-integrated spotting probe for analysis of complex biomolecule samples. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 5, p. 2549–2558, 2014.

JAIN, S.; ANAL, A. K. Optimization of extraction of functional protein hydrolysates from chicken egg shell membrane (ESM) by ultrasonic assisted extraction (UAE) and enzymatic hydrolysis. **LWT - Food Science and Technology**, v. 69, p. 295–302, 2016.

JIA, F. et al. The effect of halogenation on the antimicrobial activity, antibiofilm activity, cytotoxicity and proteolytic stability of the antimicrobial peptide Jelleine-I. **Peptides**, v. 112, p. 56–66, 2019.

GIL-CHÁVEZ, G. J. et al. Technologies for extraction and production of bioactive compounds to be used as nutraceuticals and food ingredients: An overview. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, n. 1, p. 5–23, 2013.

JOVANOVIĆ, J. R. et al. Ultrasound pretreatment as an useful tool to enhance egg white protein hydrolysis: Kinetics, reaction model, and thermodynamics. **Journal of Food Science**, v. 81, n. 11, p. 2664–2675, 2016.

KETNAWA, S. et al. Gelatin hydrolysates from farmed Giant catfish skin using alkaline proteases and its antioxidative function of simulated gastro-intestinal digestion. **Food Chemistry**, v. 192, p. 34–42, 2016.

KOVACS-NOLAN, J.; PHILLIPS, M.; MINE, Y. Advances in the value of eggs and egg components for human health. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 22, p. 8421–8431, 2005.

KUMAR, P.; KIZHAKKEDATHU, J. N.; STRAUS, S. K. Antimicrobial peptides: Diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility in vivo. **Biomolecules**, v. 8, n. 1, 2018.

LESNIEROWSKI, G.; STANGIERSKI, J. What's new in chicken egg research and technology for human health promotion? - A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 71, p. 46–51, 2018.

LI, X. et al. Antioxidant activities and functional properties of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) protein hydrolysates. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 2, p. 292–298, 2012.

LIAO, W. et al. **Egg protein-derived bioactive peptides: preparation, efficacy, and absorption**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2018. v. 85

LOHNER, K. Membrane-active antimicrobial peptides as template structures for novel antibiotic agents. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 5, p. 508–519, 2017.

MARATHE, S. J. et al. Improvements in the extraction of bioactive compounds by enzymes. **Current Opinion in Food Science**, v. 25, p. 62–72, 2019.

NALINANON, S. et al. Functionalities and antioxidant properties of protein hydrolysates from the muscle of ornate threadfin bream treated with pepsin from skipjack tuna. **Food Chemistry**, v. 124, n. 4, p. 1354–1362, 2011.

NCCLS, 2003. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard - Sixth Edition. NCCLS document M7-A6, NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania, 19087-1898 USA.

NAWROT, R. *et al.* Plant antimicrobial peptides. **Folia Microbiologica**, v. 59, n. 3, p. 181–196, 4 maio 2014.

NIKOLAEV, I. V *et al.* Emerging and traditional technologies for safe, healthy and quality food. **Emerging and Traditional Technologies for Safe, Healthy and Quality Food**, p. 329–382, 2016.

OZUNA, C. *et al.* Innovative applications of high-intensity ultrasound in the development of functional food ingredients: Production of protein hydrolysates and bioactive peptides. **Food Research International**, v. 77, p. 685–696, 2015.

PARK, A. J.; OKHOVAT, J. P.; KIM, J. Antimicrobial peptides. **Clinical and Basic Immunodermatology: Second Edition**, v. 26, n. 1, p. 81–95, 2017.

PFALZGRAFF, A.; BRANDENBURG, K.; WEINDL, G. Antimicrobial peptides and their therapeutic potential for bacterial skin infections and wounds. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, p. 1–23, 2018.

ROMANOVA, E. V.; SWEEDLER, J. V. Peptidomics for the discovery and characterization of neuropeptides and hormones. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 36, n. 9, p. 579–586, 2015.

SAADI, S. *et al.* Recent advances in food biopeptides: Production, biological functionalities and therapeutic applications. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 1, p. 80–116, 2015.

SARCINELLI; VENTURINI; SILVA. Características dos Ovos. v. 1, p. 1–16, 2007.

SEIBEL, N. F. *et al.* Qualidade física e química de ovos de codornas alimentadas com dietas modificadas. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 64, n. 1, p. 58–64, 2005.

SILA, A. *et al.* Antibacterial activity of new peptides from barbel protein hydrolysates and mode of action via a membrane damage mechanism against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Functional Foods**, v. 11, p. 322–329, 2014.

STEFANOVIĆ, A. B. *et al.* Impact of ultrasound on egg white proteins as a pretreatment for functional hydrolysates production. **European Food Research and Technology**, v. 239, n. 6, p. 979–993, 2014.

STEFANOVIĆ, A. B. *et al.* Effect of the controlled high-intensity ultrasound on improving functionality and structural changes of egg white proteins. **Food and Bioprocess Technology**, v. 10, n. 7, p. 1224–1239, 2017.

SURAI, P. F. Polyphenol compounds in the chicken/animal diet: From the past to the future. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 98, n. 1, p. 19–31, 2014.

AO, Y.; SUN, D. W. Enhancement of food processes by ultrasound: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 55, n. 4, p. 570–594, 2015.

TAVANO, O. L. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 90, p. 1–11, 2013.

THERON, L. W.; DIVOL, B. Microbial aspartic proteases: current and potential applications in industry. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 21, p.

8853–8868, 2014.

TOLDRÁ, F. *et al.* Generation of bioactive peptides during food processing. **Food Chemistry**, v. 267, n. June, p. 395–404, 2018.

TRAVKOVA, O. G.; MOEHWALD, H.; BREZESINSKI, G. The interaction of antimicrobial peptides with membranes. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 247, n. April, p. 521–532, 2017.

TU, M. *et al.* Advancement and prospects of bioinformatics analysis for studying bioactive peptides from food-derived protein: Sequence, structure, and functions. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 105, p. 7–17, 2018.

UDENIGWE, C. C.; ALUKO, R. E. Food protein-derived bioactive peptides: Production, processing, and potential health benefits. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 1, 2012.

ULUKO, H. *et al.* Effects of microwave and ultrasound pretreatments on enzymolysis of milk protein concentrate with different enzymes. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 48, n. 11, p. 2250–2257, 2013.

WANG, G.; LI, X.; WANG, Z. APD3: The antimicrobial peptide database as a tool for research and education. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. 1, p. 1087–1093, 2016.

YANG, W. T. *et al.* Effective treatment of bovine mastitis with intramammary infusion of *Angelica dahurica* and *Rheum officinale* extracts. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2019, n. 2, 2019.

YU, Z. *et al.* Novel peptides derived from egg white protein inhibiting alpha-glucosidase. **Food Chemistry**, v. 129, n. 4, p. 1376–1382, 2011.

ZHANG, Y. *et al.* Comparison of dipeptidyl peptidase IV-inhibitory activity of peptides from bovine and caprine milk casein by in silico and in vitro analyses. **International Dairy Journal**, v. 53, p. 37–44, 2016.

ZHARKOVA, M. S. *et al.* Application of antimicrobial peptides of the innate immune system in combination with conventional antibiotics-a novel way to combat antibiotic resistance? **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, 2019.

ZHOU, M. *et al.* Effect of high intensity ultrasound on physicochemical and functional properties of soybean glycinin at different ionic strengths. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 34, p. 205–213, 2016.

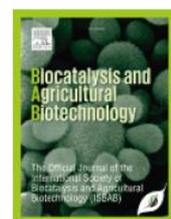
ZHU, Y. *et al.* Impact of food processing on the structural and allergenic properties of egg white. **Trends in Food Science and Technology**, v. 78, p. 188–196, 2018.

CAPÍTULO I

Otimização dos parâmetros de hidrólise das proteínas da clara do ovo caipira
para a produção de peptídeos antibacterianos

A ser submetido na:

Biocatalysis and Agricultural Biotechnology



ISSN: 1878-8181

Guia para os autores disponível em:

<https://www.elsevier.com/journals/biocatalysis-and-agricultural-biotechnology/1878-8181/guide-for-authors>

Resumo

Peptídeos antibacterianos são biomoléculas naturais que apresentam um alto potencial de aplicação no combate as cepas bacterianas patogênicas, visto que exibem um amplo espectro de ação microbicida e baixas taxas de indução à resistência. Diante disso, objetivou-se otimizar o processo de hidrólise proteica da clara do ovo caipira e prospectar peptídeos com ação antibacteriana. O percentual máximo de 31,84% de hidrólise do substrato proteico foi encontrado a partir das interações entre o pré-tratamento de sonicação ultrassônica (40kHz) durante 15 minutos e 05 segundos, e posterior hidrólise enzimática por 128 minutos e 13 segundos. O hidrolisado proteico foi ultrafiltrado em membrana de corte de 3kDa, a fração contendo peptídeos com massa molecular <3kDa foi submetida a avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração microbicida mínima (CMM) frente à nove cepas bacterianas de referência. Para o microrganismo *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 os valores de CIM e CMM foram definidos em 90 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e para as cepas *Listeria monocytogenes* ATCC 19114, e *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 os valores de CIM e CMM foram 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os microrganismos *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enteritidis* ATCC 31194, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, e *Serratia marcescens* ATCC 13880 as CIM e CMM foram definidas como 90 ng.mL^{-1} . Demonstra grande potencial bactericida da fração peptídica prospectada a partir hidrólise enzimática das proteínas da clara do ovo caipira previamente submetidas à sonicação. Desta forma, a proteólise proposta é eficiente para a prospecção de peptídeos bioativos com atividade antibacteriana.

Palavras-chave: Fragmentos de proteínas, microbicida, bactericida, <3 kDa, sonicação, 40kHz

RESUMO GRÁFICO

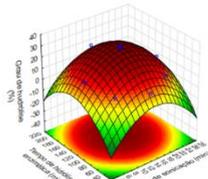
Clara do ovo de
galinha caipira



Desenho experimental



Sonicação e
proteólise enzimática

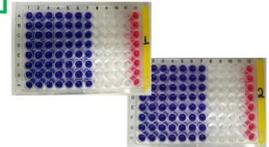


Otimização da hidrólise

Fracionamento/ centrifugação



Teste antibacteriano



PRINCIPAIS ACHADOS

- Otimização do processo de proteólise enzimática das proteínas da clara do ovo de galinha caipira.
- A hidrólise enzimática das proteínas da clara do ovo caipira previamente sonicadas liberou peptídeos com massa molecular menor que 3 kDa.
- Atividades antibacterianas de amplo espectro foram observadas a partir da fração peptídica prospectada.

Otimização dos parâmetros de hidrólise das proteínas da clara do ovo de galinha caipira para a produção de peptídeos com atividade antibacteriana

Edson Flávio Teixeira da Silva ^a, Wellington Leal dos Santos ^a, Maria Alane Pereira Barbosa ^b, Keila Aparecida Moreira ^{b,*}

^a Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil. E-mail: edsonflavios92@gmail.com; wellingtonleal16@gmail.com

^b Universidade Federal do Agreste de Pernambuco, Garanhuns, Pernambuco, Brasil. E-mail: alanebarbosa68@gmail.com; moreirakeila@hotmail.com

* **Autor de correspondência:** moreirakeila@hotmail.com / Tel: +55 (87) 37645581 ou +55 (87) 992433912.

1. Introdução

A crescente prevalência de cepas bacterianas patogênicas, multirresistentes aos fármacos tradicionalmente comercializados, tem gerado grandes preocupações acerca da saúde global (Lv et al., 2020). Diante desse fator negativo, centros de pesquisas e indústrias farmacêuticas estão redirecionando os seus estudos para o desenvolvimento de produtos alternativos capazes de atuar no combate a esses patógenos, como os peptídeos bioativos com propriedades antimicrobianas, oriundos de proteínas alimentares (Mada et al., 2020).

Peptídeos antibacterianos são fragmentos de proteínas constituídos de dois a dezenas de resíduos de aminoácidos, possuem a capacidade ligar-se aos fosfolipídeos e os ácidos lipoteicóicos presentes na membrana celular das bactérias e promover a lise celular (Ageitos et al., 2017). Exibem um amplo espectro de ação microbicida, baixas taxas de citotoxicidade e de indução de resistência nos patógenos, características que corroboram o alto potencial de aplicação como produto terapêutico (Park et al., 2017; Zharkova et al., 2019).

O ovo de galinha é um alimento que apresenta altos teores de proteínas em sua composição, baixo custo de produção, além da facilidade na prospecção e recuperação de biomoléculas derivadas, o que torna uma matéria-prima atrativa do ponto de vista biotecnológico (Guimarães et al., 2017; Zhu et al., 2018). Dentre as

suas frações, a clara do ovo é a mais utilizada em bioprocessos para a produção de produtos nutracêuticos, como os peptídeos antibacterianos (Arena et al., 2020).

A hidrólise enzimática de proteínas *in natura*, sob condições controladas, é o processo comumente empregado na prospecção de peptídeos bioativos, pois possibilita o estudo do processo de proteólise a partir de parâmetros físico-químicos que interferem na obtenção do produto final, como a temperatura, o pH, a relação enzima:substrato, o tempo de catálise, dentre outros fatores (Wu et al., 2020).

Contudo, modificações na matriz proteica através de métodos não-térmicos, como a sonicação ultrassônica, têm demonstrado melhorias no rendimento final do produto (Zhou et al., 2016). A sonicação em alta frequência, entre 20 e 100 kHz, gera zonas de cavitações e implosões das bolhas dissolvidas no substrato que resultam na modificação da estrutura proteica e exposição de sítios catalíticos que antes eram inacessíveis, aumenta a probabilidade de prospecção de peptídeos com sequências aminoacídicas exclusivas (Stefanović et al., 2018).

A maximização do processo de hidrólise enzimática do substrato proteico é necessária para um maior rendimento do produto hidrolisado, sobretudo para a prospecção de peptídeos. Métodos de modelagem estatística baseados em metodologias de superfície de resposta (MSR) representam uma importante ferramenta de avaliação do efeito individual e interativo dos parâmetros de hidrólise em função da variável resposta, grau de hidrólise (Castro e Sato, 2015).

Diante do exposto, o presente estudo foi realizado com o objetivo de otimizar os parâmetros de hidrólise das proteínas da clara do ovo de galinha caipira, previamente submetidas ao tratamento ultrassônico, numa frequência de 40 kHz, e prospectar peptídeos de massa molecular <3 kDa com ação antibacteriana.

2. Materiais e métodos

2.1 Reagentes e enzima

A solução do bioreagente de ácido picrilsulfônico 5% (2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid, TNBS), sulfito de sódio e a protease comercial pancreatina do pâncreas porcino foram adquiridos na Sigma-Aldrich® (Steinheim, Alemanha). Todos os outros produtos químicos foram comprados a partir de diferentes fornecedores comerciais.

2.2 Obtenção dos ovos de galinha caipira e preparação da solução da clara do ovo

Os ovos de galinha foram gentilmente cedidos por diferentes produtores locais da zona rural da cidade de Garanhuns, localizada na região do agreste meridional do estado de Pernambuco (**Latitude:** -8.89074, **Longitude:** -36.4966). A coleta foi realizada imediatamente após a postura, em seguida, os ovos foram higienizados com solução antisséptica (clorexidina 2%) e armazenados em caixas térmicas sob refrigeração, por conseguinte, transportados até o Laboratório de Microbiologia, Tecnologia Enzimática e Bioprodutos da Universidade Federal do Agreste de Pernambuco para a realização das análises subsequentes.

Os ovos foram lavados com álcool etílico 70° INPM e manipulados em capela de fluxo laminar, previamente higienizada e esterilizada. A casca dos ovos foi quebrada manualmente e a clara do ovo foi separada da gema. Uma alíquota de 135 mL da clara do ovo de galinha caipira foi solubilizada em 865 mL de tampão fosfato salino (pH 8,0 e 0,05 M), com o substrato proteico correspondendo a 13,5% (v/v) do volume total, após a solubilização o material foi congelado e armazenado a -20 °C para análises posteriores.

2.3 Preparação do hidrolisado proteico

2.3.1 Pré-seleção dos tempos de sonicação e hidrólise enzimática

O arranjo fatorial de tratamentos (1x4x4), constituído pela combinação entre uma enzima, quatro tempos de sonicação e quatro tempos de hidrólise proteica foi aplicado na avaliação da combinação de variáveis que resulta no mais elevado percentual do grau de hidrólise. Uma alíquota de 50 mL de solução da clara do ovo caipira foi distribuída em frascos do tipo Erlenmeyer 125 mL, o substrato proteico foi submetido ao pré-tratamento de sonicação no banho ultrassônico (USC 1600, Unique, São Paulo), numa frequência de 40 kHz. A sonicação ultrassônica foi realizada nos tempos de 0 (controle), 15, 30 e 60 minutos. Em seguida, os ensaios foram submetidos a hidrólise enzimática pela ação do pancreatina comercial numa proporção de 1:50 (v/v) enzima:substrato, cada ensaio apresentou uma concentração enzimática aproximada de 150 U.mL⁻¹. A hidrólise enzimática foi realizada nos tempos de 0 (controle), 60, 120 e 240 minutos sob as condições ótimas de pH (8,0) e temperatura (55 °C) indicadas pelo fornecedor Sigma-Aldrich. Após o processo de hidrólise, a protease foi inativada

em banho fervente a 100 °C durante 20 minutos, em seguida resfriado a 4 °C. A solução peptídica foi separada através da centrifugação do hidrolisado proteico sob as condições de 4.000 x g a 4 °C durante 20 minutos. O sobrenadante foi coletado e congelado para a análise posterior do grau de hidrólise.

2.3.2 Otimização do grau de hidrólise através da metodologia de superfície de resposta

O delineamento central composto rotacionado (DCCR) com quatro repetições do ponto central e quatro pontos axiais (12 ensaios) foi usado para determinar um padrão de resposta e no estabelecimento do modelo. As duas variáveis independentes empregadas no presente estudo foram o tempo de sonicação (minutos) (x_1) e o tempo de hidrólise enzimática (minutos) (x_2), enquanto a variável dependente foi o grau de hidrólise (%) Tabela 2.

2.4 Determinação do grau de hidrólise (GH)

O grau de hidrólise das proteínas da clara do ovo de galinha caipira foi determinado de acordo com o método descrito por Benjakul e Morrissey, (1997). Uma alíquota de 125 µL do hidrolisado proteico foi adicionada a 2,0 mL de tampão fosfato (pH 8,2 e 0,2 M) e 1,0 mL de solução de TNBS (0,01%). A solução foi misturada e colocada em banho-maria a 50 °C durante 30 minutos no escuro. A reação foi interrompida pela adição de 2,0 mL de sulfito de sódio (0,1 M). A mistura foi resfriada em temperatura ambiente durante 15 minutos. As amostras foram submetidas a análise de densidade ótica no comprimento de onda de 420 nm e α -aminoácido foi expressa em termos de L-leucina. O grau de hidrólise foi calculado de acordo com a Equação (1):

$$GH (\%) = \left(\frac{L_t - L_0}{L_{Max} - L_0} \right) * 100 \quad \text{Eq. 1}$$

Onde L_t é a quantidade de aminoácido liberada no tempo t . L_0 é a quantidade de aminoácido no substrato original solubilizado em ácido. L_{max} é o total de α -aminoácido no substrato proteico original solubilizado em ácido e liberado após a hidrólise ácida (6 M HCl a 100 °C durante 24 horas).

2.5 Fracionamento do hidrolisado proteico da clara do ovo caipira por ultrafiltração em membrana de corte de 3 kDa

O hidrolisado proteico foi fracionado para avaliar apenas a atividade antibacteriana atribuída a fração de peptídeos com massa molecular <3 kDa obtida através da hidrólise das proteínas precursoras. O processo de separação foi realizado através da ultrafiltração em membrana de corte com microporosidade de 3 kDa, Amicon® Ultra-15 (Milipore Ireland Ltd, Tullagreen, Irlanda), centrifugado a 4.000 x g durante 40 minutos a 4 °C. O material permeado foi congelado a -20 °C, liofilizado e ressuscitado em água ultrapura numa concentração inicial de 100 mg.mL⁻¹, por meio da técnica de diluição em série foram preparadas 24 amostras. A solução peptídica foi esterilizada por filtração (Millipore 0.22 µm). Todas as diluições foram congeladas e armazenadas a -20 °C para análises posteriores.

2.6 Teste antibacteriano

2.6.1 Cepas bacterianas e condições de cultivo

Bacillus cereus ATCC 11778, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Listeria monocytogenes* ATCC 19114, *Listeria monocytogenes* ATCC 19117, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enteritidis* ATCC 31194, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 e *Serratia marcescens* ATCC 13880 foram utilizadas no presente estudo. Todos os estoques de cultura celular foram mantidos a -20 °C em solução crioprotetora de glicerol a 20% (v/v). Ao longo dos experimentos, todas as cepas foram subcultivadas a cada duas semanas em meio de ágar. Antes do uso experimental, cada cepa bacteriana foi reativada, em duplicata, em caldo Mueller-Hinton durante 12 horas a 37 °C.

2.6.2 Teste de sensibilidade bacteriana

O teste de sensibilidade bacteriana aos peptídeos com massa molecular <3 kDa foi determinado pelo método de inibição do crescimento bacteriano, através da turbidez em microplaca, descrito pela norma instituída pela *Clinical & Laboratory Standards Institute - CLSI* (NCCLS, 2003). Inicialmente, as nove cepas de bactérias foram cultivadas em caldo Mueller-Hinton por 12 horas a 37 °C. Os ensaios foram compostos por 100 µL da amostra peptídica ultrafiltrada numa concentração de 100

mg.mL⁻¹, 90 µL de caldo Mueller-Hilton e 10 µL de suspensão bacteriana, previamente submetidas a uma leitura de absorvância a 600 nm em espectrofotômetro para a padronização do inóculo microbiano em 10⁸ UFC.mL⁻¹, correspondente ao valor 0,5 da escala de McFarland. O controle negativo foi composto por 100 µL de água estéril no lugar da fração peptídica <3 kDa, testado sob as mesmas condições experimentais. Todos os ensaios foram realizados em microplacas de 96 poços de poliestireno, fundo plano, estéreis e conduzidos em triplicatas. A atividade de sensibilidade bacteriana foi expressa em porcentagem de inibição de crescimento e calculada através da Equação 2:

$$\text{Inibição bacteriana (\%)} = \left(\frac{A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controle}}} \right) \times 100 \quad \text{Eq. 2}$$

Onde, A_{controle} corresponde a densidade ótica do controle positivo para o crescimento e A_{amostra} corresponde a densidade ótica da cepa bacteriana, submetidas a uma leitura de absorvância de 600 nm em leitora de microplacas.

2.6.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A concentração inibitória mínima foi determinada utilizando o teste de microdiluição de acordo com a metodologia reportada por NCCLS, (2003). Inicialmente, as cepas de bactérias cresceram em caldo Mueller-Hinton durante 12 horas a 37 °C. Em seguida, a suspensão bacteriana foi submetida a leitura de absorvância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 600 nm para a padronização do inóculo microbiano em 10⁸ CFU.mL⁻¹ correspondendo a 0,5 na escala de McFarland. Os testes foram compostos por 100 µL da amostra peptídica ultrafiltrada, nas respectivas concentrações a serem testadas, 90 µL de caldo Mueller-Hilton e 10 µL de suspensão bacteriana. O controle negativo foi composto por 100 µL de água esterilizada no lugar da solução peptídica, testada sob as mesmas condições experimentais. Todos os testes foram realizados em microplacas de poliestireno, fundo chato, estéreis e conduzidos em triplicata. A atividade antibacteriana foi expressa em percentual de CIM (%) e calculada utilizando a Equação (3):

$$\text{CIM (\%)} = \left(\frac{A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controle}}} \right) * 100 \quad \text{Eq. 3}$$

Onde, A_{controle} corresponde a densidade ótica do controle positivo para o crescimento e A_{amostra} corresponde a densidade ótica da cepa bacteriana, submetidas a uma leitura de absorvância de 600 nm em leitora de microplacas.

2.6.4 Determinação da concentração microbicida mínima (CMM)

A concentração microbicida mínima foi determinada utilizando o teste de microdiluição de acordo com a metodologia reportada por NCCLS, (2003). A CMM foi realizada nas concentrações peptídicas que apresentaram inibição para o crescimento bacteriano. A confirmação da ação bactericida/bacteriostática das diluições foi realizada através do plaqueamento de 100 μL da solução peptídica no meio de cultura de ágar Mueller-Hinton. Em seguida, as placas foram analisadas e classificadas de acordo com a presença ou ausência de crescimento microbiano.

2.7 Análises estatísticas

O software Statistica® 10.0 StatSoft Inc (Tulsa, Oklahoma, EUA) foi empregado na construção do designer experimental, análise dos dados a partir dos valores expressos em médias aritméticas e validação do modelo experimental. O teste de *Tukey* foi utilizado para verificar as diferenças estatísticas entre os grupos analisados. Quando $p < 0,05$, as diferenças foram consideradas significativas.

3. Resultados e discussões

3.1 Pré-seleção dos tempos de sonicação e hidrólise enzimática

A pancreatina comercial demonstrou aptidão na atividade hidrolítica das proteínas da clara do ovo caipira em todos os testes empregados no arranjo fatorial de tratamentos (1x4x4). Os resultados referentes ao grau de hidrólise das proteínas da clara do ovo caipira estão representados na Tabela 1.

Os testes que receberam o pré-tratamento de sonicação apresentam alterações positivas na susceptibilidade a digestão pela pancreatina comercial quando comparados aos ensaios do grupo controle. O valor máximo do grau de hidrólise observado foi de 30,33%, no tratamento submetido a 15 minutos de sonicação e 120

minutos de hidrólise enzimática. Esse valor diferiu estatisticamente ($p < 0,05$) de todos os outros tratamentos, tanto os submetidos ao mesmo tempo de sonicação em diferentes momentos de hidrólise enzimática quanto os submetidos ao mesmo tempo de hidrólise enzimática em diferentes tempos de sonicação.

Knezevic-jugovic et al. (2012), Stefanovic et al. (2014) e Stefanovic et al. (2017) avaliaram em seus estudos o grau de hidrólise de proteínas resultante das interações entre diferentes tempos de sonicação e hidrólise enzimática. Apesar do uso de diferentes enzimas proteolíticas, o comportamento mostrou-se semelhante, com percentuais máximos de hidrólise nos testes submetidos à sonicação durante 15 minutos, variando apenas os tempos ótimos de hidrólise enzimática e os percentuais de hidrólise obtidas em cada estudo, conseqüentemente.

Stefanovic et al. (2017) empregaram duas frequências de sonicação (20 e 40 kHz), em ambas frequências, os testes expostos a 15 minutos de sonicação apresentaram o mais elevado grau de hidrólise pelas enzimas empregadas, com valores próximos a 30%, demonstrando o caráter promissor da aplicação da tecnologia ultrassônica como forma de pré-tratamento do substrato proteico com a finalidade de aumentar a percentual de hidrólise.

Ao estudar os efeitos da sonicação prolongada de proteínas da clara do ovo a uma frequência de 40 kHz, Knezevic-jugovic et al. (2012) relataram um aumento no grau de hidrólise nos ensaios submetidos a 30 minutos de sonicação, diferindo dos resultados encontrados no presente estudo, onde o grau de hidrólise apresentou diminuição nos ensaios sonicados por 30 e 60 minutos.

Para Uluko et al., (2013), as alterações do substrato na susceptibilidade à catálise enzimática depende de fatores como o tempo de sonicação, a frequência e o poder sonoro aplicado, esses fatores interferem diretamente na modificação da estrutura proteica, permitindo a exibição de locais catalíticos que estavam em regiões hidrofóbicas ou mesmo a inativação de locais de catálise pré-disponíveis.

Os estudos apresentados utilizaram proteínas de clara de ovo de origem industrial, também denominadas granja, enquanto no presente trabalho foram utilizadas proteínas de clara de ovo de galinha caipira. No entanto, é importante ressaltar que, embora o ovo de galinha caipira possua algumas proteínas exclusivas, o percentual e a composição geral de proteínas tendem a ser semelhantes,

independentemente da origem do ovo, tornando a comparação válida (Hioki et al., 2014).

De maneira geral, os resultados obtidos no processo elucidam a necessidade de empregar métodos estatísticos mais elaborados como os delineamentos de otimização, com a finalidade de encontrar um ponto ideal de interação entre as variáveis independentes (tempo de sonicação e tempo de hidrólise enzimática), pois é visível que o aumento ou diminuição dos tempos de ação desses fatores interfere diretamente na variável resposta (grau de hidrólise).

3.2 Otimização do grau de hidrólise das proteínas da clara do ovo caipira

Para otimizar o processo de hidrólise, é necessário determinar quais condições e variáveis independentes afetam significativamente o grau de hidrólise do substrato proteico. A matriz de delineamento central composto rotacionado com as variáveis independentes (tempo de sonicação e tempo de hidrólise enzimática) e os resultados médios do grau de hidrólise estão representados na Tabela 2.

Nas condições da matriz do desenho experimental, o grau de hidrólise variou de $7,75 \pm 0,39\%$ a $33,50 \pm 0,92\%$, confirmando a importância do planejamento estatístico para a avaliação do mais elevado grau de hidrólise e consequente prospecção de bioprodutos. A partir dos dados obtidos experimentalmente para a variável resposta, a significância do modelo foi avaliada pela análise de variância (ANOVA) e apresentada na Tabela 3, onde pode ser visto que o ajuste foi estatisticamente significativo.

A qualidade do ajuste modelado também foi medida pelo coeficiente de determinação $R^2 = 0,9622$, indicou que o modelo ajustado explica 96,22% da variação total da atividade residual. O modelo mencionado pode ser usado para prever o grau de hidrólise no campo experimental estudado. Os efeitos das variáveis significativas e de suas interações foram estimados e apresentados na Tabela 4.

Os resultados dos efeitos das variáveis independentes indicam que tanto o tempo de sonicação quanto o tempo de hidrólise em termos quadráticos possuem efeitos negativos, enquanto o tempo de hidrólise em termos lineares tem efeito positivo, sendo considerado estatisticamente significativo ($p < 0,05$) para o aumento do grau de hidrólise das proteínas da clara do ovo caipira.

O rendimento máximo para o grau de hidrólise das proteínas de clara de ovo caipira foi determinado através da análise das superfícies de resposta e dos valores previstos pelo modelo estatístico empregado. Os resultados previstos mostraram que a porcentagem máxima do grau de hidrólise seria obtida nas seguintes condições: tempo de sonicação de 15 minutos e 05 segundos e tempo de hidrólise enzimática de 128 minutos e 13 segundos, resultando em um valor máximo esperado de hidrólise de 31,84%.

Os efeitos das variáveis independentes (tempo de sonicação e tempo de hidrólise enzimática) estão ilustrados na superfície de resposta e curva de contorno (Figura 1). Experimentos adicionais foram realizados nas condições ótimas, visando à validação do método estatístico como modelo reproduzível, o percentual máximo de hidrólise obtido foi de $32,40 \pm 0,10\%$, esse valor indicou a validação do modelo e a existência de um ponto ótimo.

Em geral, pode-se dizer que os métodos de modelagem estatística aplicados nos bioprocessos ajudam a diminuir o número total de experimentos e, conseqüentemente, o tempo de execução, resultando em economia de recursos financeiros, bem como na geração de benefícios para a renda do produto final, especialmente quando os pontos ótimos são determinados para cada variável estudada (Uluko et al., 2013; Zhou et al., 2016; Jiang et al., 2018).

3.3 Atividade antibacteriana

Todas as nove cepas testadas apresentaram sensibilidade aos peptídeos com massa molecular menor que 3 kDa prospectados a partir da hidrólise enzimática das proteínas da clara do ovo caipira, os valores de inibição do crescimento foram de 100% para a concentração de 100 mg.mL⁻¹.

Os valores de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração microbicida mínima (CMM) para cada cepa utilizada no presente estudo foram identificados e estão representados na Tabela 5. De acordo com os dados apresentados, os valores de CIM encontrados são idênticos aos valores de CMM para cada cepa bacteriana, indicando a ação bactericida de amplo espectro dos peptídeos avaliados.

Em geral, a fração peptídica mostrou maior afinidade antibacteriana para cepas classificadas como Gram-negativas, pois todas as cinco cepas testadas foram

submetidas a ação bactericida na menor concentração de peptídeo aplicada no teste (90 ng.mL^{-1}). Em relação as bactérias Gram-positivas, apenas duas cepas foram sensíveis a essa concentração a concentração de 90 ng.mL^{-1} , as outras três cepas gram-positivas foram sensíveis a concentrações entre 1 e $90 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ de peptídeos.

Sabe-se que a presença ou ausência, bem como a intensidade do potencial antibacteriano, depende principalmente da interação entre os peptídeos antimicrobianos e a parede celular bacteriana. Essa interação sugere que peptídeos carregados negativamente têm maior afinidade por membranas carregadas positivamente, portanto, peptídeos carregados positivamente têm afinidade por membranas carregadas negativamente (Glinel et al., 2012).

De acordo com Bhat et al., (2015); Ageitos et al., (2017), a eficácia dos peptídeos e o modo de ação dependem das características estruturais intrínsecas desses agentes bioativos, como composição de aminoácidos, hidrofobicidade, distribuição da carga elétrica pela matriz peptídica, entre outros fatores que podem desencadear sensibilidade variada aos microrganismos, uma vez que os componentes da membrana podem apresentar modificações de uma cepa de microrganismos para outra, principalmente quando aplicadas a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Estudos sobre a atividade antimicrobiana de peptídeos geralmente se concentram na prospecção de substâncias com massa molecular menor que 3 kDa, visto que peptídeos com baixa massa molecular, mesmo em baixas concentrações, têm demonstrado alto poder antibacteriano quando comparados aos de alta massa molecular (Abdel-Hamid et al., 2016).

Os resultados positivos para a ação antibacteriana de substâncias naturais, como peptídeos bioativos, demonstram o caráter promissor dessa classe de biomoléculas no combate a agentes infecciosos que têm um grande impacto negativo na saúde humana e animal, além de provar a importância de estudos científicos na prospecção de substâncias antimicrobianas de origem natural (Yang et al., 2019).

Cepas de *E. coli* e *Salmonella* sp. são considerados os microrganismos contaminantes mais comuns em alimentos, representam um grande risco saúde pública devido ao risco de surtos de toxinfecções alimentares (Daliri et al., 2017). Alguns estudos têm identificado o potencial antimicrobiano de peptídeos com cadeia estrutural natural, prospectados a partir das proteínas da clara do ovo contra os

gêneros *Escherichia* sp., *Leuconostoc* sp. e *Staphylococcus* sp., e encontraram valores de concentração inibitória mínima nos ensaios contendo 10 µg.mL⁻¹ de peptídeos, por exemplo (Memarpour-Yazdi; Asoodeh; Chamani, 2012; Bhat; Kumar; Bhat, 2015).

Singh *et al.*, (2020) conseguiram prospectar peptídeos semissintéticos que apresentaram concentrações inibitórias mínimas em microgramas, como resultado de alterações estruturais pelas técnicas de sulfonação e lipidificação de α-aminoácidos, nesse trabalho o teste foi realizado apenas contra uma cepa de *Staphylococcus aureus* resistente à classe das meticilinas e a CIM foi definida em 1 µg.mL⁻¹.

Os valores de CIM e CMM encontrados no presente estudo, elucidam o alto potencial antibacteriano expresso pelos peptídeos com massa molecular <3 kDa prospectados a partir da hidrólise enzimática das proteínas da clara do ovo caipira previamente modificadas por sonicação ultrassônica.

4. Conclusões

Os peptídeos com massa molecular <3 kDa prospectados a partir da hidrólise proteica da clara do ovo caipira pré-tratada por sonicação ultrassônica numa frequência de 40 kHz demonstram-se efetivos quanto a atividade antibacteriana frente as nove cepas de microrganismos testadas. O tempo de sonicação de 15 minutos e 05 segundos associado ao tempo de hidrólise enzimática de 128 minutos e 13 segundos são apontados, por meio de análise estatística, como o mais promissor para a prospecção de tais peptídeos aplicados no presente estudo.

A prospecção de peptídeos com atividade antibacteriana de amplo espectro a partir de fontes naturais de baixo custo de obtenção como os ovos de galinha caipira demonstra-se um importante aliado no combate às cepas bacterianas patogênicas, incluindo a possibilidade de aplicações contra cepas multirresistentes aos fármacos antimicrobianos comumente comercializados.

5. Referências

- Abdel-Hamid, M., Goda, H.A., De Gobba, C., Jenssen, H., Osman, A., 2016. Antibacterial activity of papain hydrolysed camel whey and its fractions. *Int. Dairy J.* 61, 91–98. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.04.004>
- Ageitos, J.M., Sánchez-Pérez, A., Calo-Mata, P., Villa, T.G., 2017. Antimicrobial peptides (AMPs): Ancient compounds that represent novel weapons in the fight

- against bacteria. *Biochem. Pharmacol.* 133, 117–138. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.09.018>
- Arena, S., Renzone, G., Scaloni, A., 2020. A multi-approach peptidomic analysis of hen egg white reveals novel putative bioactive molecules. *J. Proteomics* 215, 103646. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.103646>
- Balouiri, M., Sadiki, M., Ibensouda, S.K., 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J. Pharm. Anal.* 6, 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Benjakul, S., Morrissey, M.T., 1997. Protein Hydrolysates from Pacific Whiting Solid Wastes Protein Hydrolysates from Pacific Whiting Solid Wastes. *J. Agric. Food Chem.* 45, 3423–3430. <https://doi.org/10.1021/jf970294g>
- Bhat, Z.F., Kumar, S., Bhat, H.F., 2015. Bioactive peptides of animal origin: a review. *J. Food Sci. Technol.* 52, 5377–5392. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1731-5>
- Castro, R.J.S. de, Sato, H.H., 2015. A response surface approach on optimization of hydrolysis parameters for the production of egg white protein hydrolysates with antioxidant activities. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 4, 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2014.07.001>
- Daliri, E., Oh, D., Lee, B., 2017. Bioactive Peptides. *Foods* 6, 32. <https://doi.org/10.3390/foods6050032>
- Glinel, K., Thebault, P., Humblot, V., Pradier, C.M., Jouenne, T., 2012. Antibacterial surfaces developed from bio-inspired approaches. *Acta Biomater.* 8, 1670–1684. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.01.011>
- Guimarães, D., Amaral, G., Maia, G., Lemos, M., Custodio, S., 2017. Avicultura de postura: estrutura da cadeia produtiva, panorama do setor no Brasil e no mundo e o apoio do BNDES. *Agroindústria* 45, 85–136.
- Hioki, Y., Tanimura, R., Iwamoto, S., Tanaka, K., 2014. Nano-LC/MALDI-MS using a column-integrated spotting probe for analysis of complex biomolecule samples. *Anal. Chem.* 86, 2549–2558. <https://doi.org/10.1021/ac4037069>
- Jiang, J., Ding, G., Zhang, J., Zou, Y., Qin, S., 2018. A Systematic Optimization Design Method for Complex Mechatronic Products Design and Development. *Math. Probl. Eng.* 2018, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2018/3159637>
- Knezevic-Jugovic, Z.D., Stefanović, A.B., Žuža, M.G., Milovanović, S.L., Jakovetić, S.M., Manojlović, V.B., Bugarski, B.M., 2012. Effects of sonication and high-pressure carbon dioxide processing on enzymatic hydrolysis of egg white proteins. *Acta Period. Technol.* 43, 33–41. <https://doi.org/10.2298/APT1243033K>
- Lv, J., Deng, S., Zhang, L., 2020. A review of artificial intelligence applications for antimicrobial resistance. *Biosaf. Heal.* 106408. <https://doi.org/10.1016/j.bsheal.2020.08.003>
- Mada, S.B., Ugwu, C.P., Abarshi, M.M., 2020. Health Promoting Effects of Food-Derived Bioactive Peptides: A Review. *Int. J. Pept. Res. Ther.* 26, 831–848. <https://doi.org/10.1007/s10989-019-09890-8>
- Memarpoor-Yazdi, M., Asoodeh, A., Chamani, J.K., 2012. A novel antioxidant and antimicrobial peptide from hen egg white lysozyme hydrolysates. *J. Funct. Foods* 4, 278–286. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2011.12.004>

- NCCLS, 2003. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard - Sixth Edition. NCCLS document M7-A6, NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania, 19087-1898 USA.
- Park, A.J., Okhovat, J.-P., Kim, J., 2017. Antimicrobial Peptides, in: Gaspari, A.A., Tyring, S.K., Kaplan, D.H. (Eds.), *Clinical and Basic Immunodermatology*. Springer International Publishing, Cham, pp. 81–95. https://doi.org/10.1007/978-3-319-29785-9_6
- Singh, S., Wang, M., Gao, R., Teng, P., Odom, T., Zhang, E., Xu, H., Cai, J., 2020. Lipidated α /Sulfono- α -AA heterogeneous peptides as antimicrobial agents for MRSA. *Bioorg. Med. Chem.* 28, 115241. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.115241>
- Stefanović, A.B., Jovanović, J.R., Balanč, B.D., Šekuljica, N.Z., Tanasković, S.M.J., Dojčinović, M.B., Knezevic-Jugovic, Z.D., 2018. Influence of ultrasound probe treatment time and protease type on functional and physicochemical characteristics of egg white protein hydrolysates. *Poult. Sci.* 97, 2218–2229. <https://doi.org/10.3382/ps/pey055>
- Stefanović, A.B., Jovanović, J.R., Dojčinović, M.B., Lević, S.M., Nedović, V.A., Bugarski, B.M., Knežević-Jugović, Z.D., 2017. Effect of the Controlled High-Intensity Ultrasound on Improving Functionality and Structural Changes of Egg White Proteins. *Food Bioprocess Technol.* 10, 1224–1239. <https://doi.org/10.1007/s11947-017-1884-5>
- Stefanović, A.B., Jovanović, J.R., Grbavčić, S., Šekuljica, N., Manojlović, V.B., Bugarski, B.M., Knežević-Jugović, Z.D., 2014. Impact of ultrasound on egg white proteins as a pretreatment for functional hydrolysates production. *Eur. Food Res. Technol.* 239, 979–993. <https://doi.org/10.1007/s00217-014-2295-8>
- Uluko, H., Zhang, S., Liu, L., Chen, J., Sun, Y., Su, Y., Li, H., Cui, W., Lv, J., 2013. Effects of microwave and ultrasound pretreatments on enzymolysis of milk protein concentrate with different enzymes. *Int. J. Food Sci. Technol.* 48, 2250–2257. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12211>
- Wu, D., Tu, M., Wang, Z., Wu, C., Yu, C., Battino, M., El-Seedi, H.R., Du, M., 2020. Biological and conventional food processing modifications on food proteins: Structure, functionality, and bioactivity. *Biotechnol. Adv.* 40. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107491>
- Yang, W.T., Ke, C.Y., Wu, W.T., Lee, R.P., Tseng, Y.H., 2019. Effective treatment of bovine mastitis with intramammary infusion of angelica dahurica and rheum officinale extracts. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/7242705>
- Zharkova, M.S., Orlov, D.S., Golubeva, O.Y., Chakchir, O.B., Eliseev, I.E., Grinchuk, T.M., Shamova, O. V., 2019. Application of antimicrobial peptides of the innate immune system in combination with conventional antibiotics-a novel way to combat antibiotic resistance? *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00128>
- Zhou, M., Liu, J., Zhou, Y., Huang, X., Liu, F., Pan, S., Hu, H., 2016. Effect of high intensity ultrasound on physicochemical and functional properties of soybean

glycinin at different ionic strengths. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 34, 205–213. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.02.007>

Zhu, Y., Vanga, S.K., Wang, J., Raghavan, V., 2018. Impact of food processing on the structural and allergenic properties of egg white. *Trends Food Sci. Technol.* 78, 188–196. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.06.005>

Tabela 1. Grau de hidrólise das proteínas da clara do ovo caipira pela ação da pancreatina comercial obtido através da interação entre diferentes tempos de sonicação e hidrólise enzimática.

Tempo de sonicação	Tempo de hidrólise enzimática			
	0 min (controle)	60 min	120 min	240 min
0 min (controle)	0,13 ± 0,01 ^{Da}	6,70 ± 0,15 ^{Cd}	12,59 ± 0,32 ^{Ad}	10,55 ± 0,22 ^{Bd}
15 min	0,40 ± 0,10 ^{Da}	15,98 ± 0,11 ^{Ca}	30,33 ± 1,78 ^{Aa}	14,85 ± 0,41 ^{Ba}
30 min	0,90 ± 0,11 ^{Da}	12,16 ± 1,29 ^{Cb}	19,30 ± 0,40 ^{Ab}	16,60 ± 0,35 ^{Bb}
60 min	1,20 ± 0,18 ^{Da}	8,84 ± 0,32 ^{Cc}	14,20 ± 0,14 ^{Ac}	12,42 ± 0,03 ^{Bc}
	CV 1 (%) = 5,49		CV 2 (%) = 4,64	

Letras maiúsculas iguais em linha (Tempo de hidrólise enzimática) e letras minúsculas iguais em colunas (Tempo de sonicação) indicam que não há diferenças significativas entre os tratamentos para ($p < 0,05$). CV 1 (%) e CV 2 (%) correspondem ao coeficiente de variação gerado pelo teste de *Tukey*.

Tabela 2. Matriz DCCR com valores reais e codificados para as variáveis dependentes e o percentual do grau de hidrólise das proteínas da clara do ovo de galinha caipira.

Ensaio	X₁ Tempo de sonicação	X₂ Tempo de hidrólise enzimática	Grau de hidrólise
1	07min30s (-1)	60min (-1)	8,22 ± 0,54%
2	07min30s (+1)	180min (+1)	10,16 ± 0,13%
3	22min30s (-1)	60min (-1)	11,38 ± 0,96%
4	22min30s (+1)	180min (+1)	12,60 ± 0,07%
5	04min39s (-1,41)	120min (0)	13,90 ± 0,44%
6	26min01s (+1,41)	120min (0)	12,02 ± 0,31%
7	15min (0)	35min14s (-1,41)	7,75 ± 0,39%
8	15min (0)	205min05s (+1,41)	18,70 ± 0,27%
9	15min (0)	120min (0)	31,30 ± 0,11%
10	15min (0)	120min (0)	32,90 ± 0,30%
11	15min (0)	120min (0)	29,09 ± 0,65%
12	15min (0)	120min (0)	33,50 ± 0,92%

Tabela 3. ANOVA dos modelos de regressão para o grau de hidrólise das proteínas da clara do ovo caipira

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Média dos quadrados	<i>fcal</i>	<i>p-valor</i>
(1) Tempo de sonicação (L)	3,658	1	3,6581	0,9418	0,40338
Tempo de sonicação (Q)	639,635	1	639,6352	164,6836	0,00102*
(2) Tempo de hidrólise enzimática (L)	58,086	1	58,0859	14,9551	0,03058*
Tempo de hidrólise enzimática (Q)	631,668	1	631,6683	162,6324	0,00104*
1L e 2L	0,085	1	0,0848	0,0218	0,89188
Falta de ajuste	31,661	3	10,5538	2,7172	0,21672
Erro puro	11,652	3	3,8840		
Total	1147,820	11			

*: Estatisticamente significativa. Nível de confiança de 95%.

Tabela 4. Estimativa dos efeitos das variáveis significativas para o grau de hidrólise das proteínas da clara do ovo caipira

Fonte de variação	Efeito	t	p-valor
(1) Tempo de sonicação (L)	1,3397	0,9705	0,4033
Tempo de sonicação (Q)	-19,2592	-12,8329	0,0010
(2) Tempo de hidrólise enzimática (L)	5,3798	3,8672	0,0305
Tempo de hidrólise enzimática (Q)	-19,7989	-12,7527	0,0010
1L e 2L	-0,2912	-0,1478	0,8918

*: Estatisticamente significante. Nível de confiança de 95%.

Tabela 5. Valores de concentração inibitória mínima e concentração microbicida mínima da fração peptídica com massa molecular <3 kDa prospectada a partir da hidrólise enzimática das proteínas da clara do ovo caipira.

N	Cepa bacteriana	Classificação	CIM	CMM
1	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	Gram-positiva	90 ng.mL ⁻¹	90 ng.mL ⁻¹
2	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Gram-positiva	90 µg.mL ⁻¹	90 µg.mL ⁻¹
3	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19114	Gram-positiva	1 µg.mL ⁻¹	1 µg.mL ⁻¹
4	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19117	Gram-positiva	1 µg.mL ⁻¹	1 ng.mL ⁻¹
5	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	Gram-negativa	90 ng.mL ⁻¹	90 ng.mL ⁻¹
6	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Gram-negativa	90 ng.mL ⁻¹	90 ng.mL ⁻¹
7	<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 31194	Gram-negativa	90 ng.mL ⁻¹	90 ng.mL ⁻¹
8	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	Gram-negativa	90 ng.mL ⁻¹	90 ng.mL ⁻¹
9	<i>Serratia marcescens</i> ATCC 13880	Gram-negativa	90 ng.mL ⁻¹	90 ng.mL ⁻¹

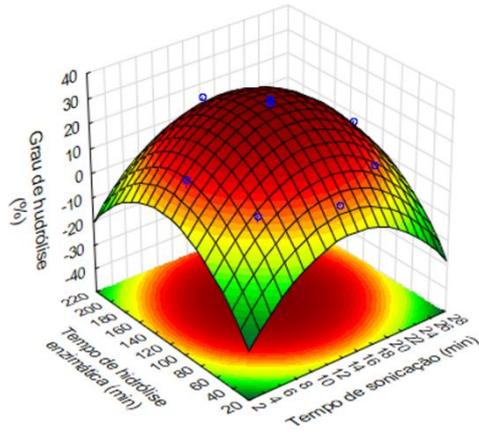
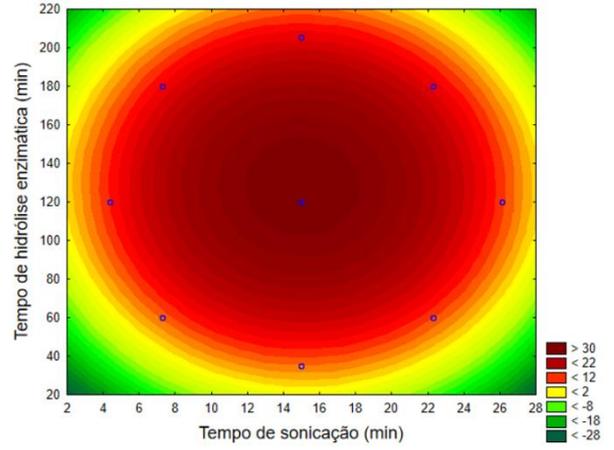
A**B**

Figura 1. Gráfico de superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para o grau de hidrólise das proteínas da clara do ovo caipira em função dos tempos de sonicação e hidrólise enzimática.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A proposta de utilização de proteínas da clara do ovo caipira para a prospecção de peptídeos bioativos, sobretudo peptídeos com atividade antibacteriana, a partir da combinação entre os processos de sonicação e proteólise enzimática, demonstra-se eficiente e viável do ponto de vista biotecnológico;
- O grau de hidrólise das proteínas da clara do ovo caipira obtido por meio do pré-tratamento de sonicação e posterior proteólise enzimática, foi maximizado através de inferências estatísticas baseadas no planejamento do tipo Delineamento Central Composto Rotacionado;
- A técnica de ultrafiltração demonstrou-se eficaz no processo de separação da fração peptídica com massa molecular <3 kDa;
- Os peptídeos prospectados a partir da clara do ovo caipira com massa <3 kDa demonstraram amplo espectro de inibição do crescimento microbiano frente às cepas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas testadas, mesmo em concentrações baixas;
- A partir de caracterizações mais aprofundadas acerca da atividade citotóxica, pode ser possível a aplicação dos peptídeos nas indústrias farmacêuticas e alimentícias.