



UFRPE

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

JOSÉ ERICK GALINDO GOMES

Avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante de peptídeos obtidos a partir da hidrólise da caseína caprina por proteases do látex da quixabeira (*Sideroxylon obtusifolium*)

RECIFE - PE

2014

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

JOSÉ ERICK GALINDO GOMES

Avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante de peptídeos obtidos a partir da hidrólise da caseína caprina por proteases do látex da quixabeira (*Sideroxylon obtusifolium*)

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

Orientadora: Dra. Keila Aparecida Moreira

RECIFE - PE

2014

G633a Gomes, José Erick Galindo
 Avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante de
 peptídeos obtidos a partir da hidrólise da caseína caprina por
 proteases do látex da quixabeira (*Sideroxylon obtusifolium*) /
 José Erick Galindo Gomes. – Recife, 2014.
 69 f. : il.

 Orientadora: Keila Aparecida Moreira.
 Dissertação (Mestrado em Biociência Animal) –
 Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento
 de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife, 2014.
 Referências.

 1. Caseína caprina 2. Peptídeos bioativos 3. Látex
 4. Quixaba 5. *Sideroxylon obtusifolium* I. Moreira, Keila
 Aparecida, orientadora II. Título

CDD 636.089

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

Parecer da comissão examinadora da defesa de dissertação de mestrado de
JOSÉ ERICK GALINDO GOMES

Avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante de peptídeos obtidos a partir da
hidrólise da caseína caprina por proteases do látex da quixabeira (*Sideroxylon
obtusifolium*)

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

Dissertação apresentada e aprovada pela comissão examinadora:

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

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

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

Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto (Membro Interno)
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal - UFRPE

*Ào meu falecido pai que sempre me deu apoio
incondicional em todas as etapas da minha
vida, mas que infelizmente não pode estar
presente em mais esta vitória.*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus por todas as oportunidades concedidas para alcançar meu objetivo maior, pela força para superar os obstáculos e ultrapassar as barreiras impostas ao longo do percurso.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, pela oportunidade e apoio concedido para a realização deste curso de pós-graduação, sendo fornecido todo apoio estrutural e educacional. Ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal (PPGBA) por fornecer um excelente nível de conhecimentos e possuir um corpo docente comprometido com a formação de mestres e doutores.

À FACEPE pela concessão da bolsa de pós-graduação em nível de mestrado, sendo este apoio financeiro fundamental para o término deste trabalho.

A professora Keila Aparecida Moreira, minha orientadora desde os tempos de graduação, pelos seis anos de trabalho em conjunto, a qual tem todo meu apreço e consideração, pois sempre depositou em mim sua confiança, e passou seus conhecimentos sem nenhuma hesitação.

A minha família, em especial a minha Mãe, por ser acima de tudo uma guerreira, sempre apoiando as minhas decisões de vida, tanto profissional quanto pessoal, estando ao meu lado em todos os momentos.

A minha irmã Graziela, por ser mais que uma irmã, por ser minha cúmplice e dividir comigo os momentos de alegria e tristeza.

Aos amigos Soraya Alves, João Batista e João Augusto, por além da amizade, sempre me acolherem em Recife com muito apreço quando precisei.

As amigas vindas de longe Francieli Goelzer e Amanda Sena, que embelezaram nosso ambiente de trabalho e compartilharam conosco seus conhecimentos, tornando-se mais que colegas de trabalho, uma amizade que valorizarei para todo o sempre.

A todos os meus colegas de trabalho do laboratório de biotecnologia do CENLAG/UAG. Em especial ao grupo Bioativos, desde os PAVIs, ICs e Pós-Graduandos, que sempre estiveram presentes ao longo deste árduo trabalho.

Aos meus queridos amigos Rafael de Lima, Talita Camila, Patricia Lins, Mariana Sanchez, Alana Soares, Anna Carolina, Elieudes Alves, Ivaldo Almeida, Atanásio Neto e Pablo Pontes por estarem comigo, me ajudando sempre nos momentos que precisei, por toda amizade dedicada, pessoas especiais que levarei comigo por todo o sempre.

Obrigado!

“Foi o tempo que dedicastes à tua rosa que a fez tão importante”

Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

A busca de novas moléculas que apresentem atividades biológicas para auxiliar as funções fisiológicas nos organismos, como, atividades antimicrobiana e antioxidante vêm ganhando espaço no âmbito científico. A resistência microbiana causada por antibióticos já conhecidos e utilizados impulsionou a indústria farmacêutica a realizar pesquisas para descobrir novas substâncias. Atualmente, a obtenção de peptídeos bioativos provenientes de diversas fontes proteicas, como a caseína, estimulam a procura por novas enzimas proteolíticas. O presente trabalho objetivou avaliar o potencial das proteases presentes no látex da quixaba (*Sideroxylon obtusifolium*) em hidrolisar a caseína caprina e liberar peptídeos com atividades antimicrobiana e antioxidante. O látex de *S. obtusifolium* obtido a partir dos frutos foi submetido às técnicas de eletroforese SDS-PAGE e zimograma. A caseína caprina foi hidrolisada utilizando planejamento estatístico fatorial 2^3 , totalizando 12 ensaios, avaliando como efeitos a relação enzima/substrato (1:50, 1:100 e 1:150), tempo de hidrólise (8, 16 e 24 horas) e temperatura (28, 34 e 40 °C). Para a determinação do grau de hidrólise utilizou-se o ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (TNBS) e eletroforese Tricina-SDS-PAGE de cada hidrolisado. As frações de peptídeos foram separadas por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (RP-HPLC). As atividades antimicrobianas e antioxidantes foram avaliadas para todas as frações coletadas. A presença de duas proteases distintas foram detectadas em zimograma, sendo estas enzimas eficientes na hidrólise da caseína caprina, apresentando grau de hidrólise (GH) máximo de $35,086 \pm 0,56\%$ no ensaio 7 (40 °C, 24h e 1:50). Foram liberados peptídeos com massas moleculares menores que 4 kDa e um total de 15 frações coletadas e analisadas. Destas frações, para a atividade antimicrobiana, nove apresentaram atividade frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, as demais foram eficientes contra bactérias Gram-negativas. Todas as frações apresentaram atividade antioxidante, as frações 6 e 12 demonstrando potencial sequestrante em relação ao radical $ABTS^{+}$, de $50,884 \pm 0,42$ e $51,98 \pm 0,17$, respectivamente. As enzimas presentes no látex dos frutos de *S. obtusifolium* foram capazes de hidrolisar a caseína caprina, liberando peptídeos com as atividades biológicas propostas neste trabalho.

Palavras-chave: caseína caprina, peptídeos bioativos, látex, quixaba, *Sideroxylon obtusifolium*

ABSTRACT

The search for new molecules with biological activities to assist the physiological functions in organisms, such as, antimicrobial and antioxidant activities have been gaining ground in the scientific realm. The known microbial resistance caused by antibiotics used and boosted the pharmaceutical industry to conduct research to discover new substances. Currently, the obtaining of bioactive peptides from various protein sources such as casein stimulates the search for new proteolytic enzymes. These studies aimed to evaluate the potential of proteases present in the latex of quixaba (*Sideroxylon obtusifolium*) in goat casein hydrolyze and release peptides with antimicrobial and antioxidant activities. The latex obtained from *S. obtusifolium* fruit was subjected to the techniques of SDS-PAGE and zymogram. The goat casein was hydrolyzed using 2³ factorial statistical design, totaling 12 trials evaluating the effects as an enzyme/substrate (1:50, 1:100 and 1:150), hydrolysis time (8, 16 and 24 hours) and temperature (28, 34 and 40 °C). To determine the degree of hydrolysis was used the 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) and electrophoresis Tricine-SDS-PAGE of each hydrolyzate. The fractions of peptides were separated by high performance liquid chromatography (RP-HPLC). Antimicrobial and antioxidant activities were evaluated for all collected fractions. The presence of two different proteases was detected in zymograms, which are effective in hydrolyzing enzymes of goat casein, with degree of hydrolysis (DH) up to 35.086±0.56% in run 7 (40 °C, 24h and 1: 50). Peptides with molecular masses lower than 4 kDa and a total of 15 fractions were collected and analyzed released. These fractions for antimicrobial activity, nine showed activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, the others were effective against Gram-negative bacteria. All fractions exhibited antioxidant activity, the fractions demonstrating 6 and 12 sequestering potential with respect to the radical ABTS⁺, 50.884±0.42% and 51.98±0.17%, respectively. The enzymes present in the latex of the fruits of *S. obtusifolium* were able to hydrolyze casein goats, releasing peptides with biological activities proposed in this work.

Keywords: goat casein, bioactive peptides, latex, quixaba, *Sideroxylon obtusifolium*

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO	16
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
1.1. Proteases	17
1.2. Enzimas proteolíticas em vegetais	20
1.3. Quixabeira (<i>Sideroxylon obtusifolium</i>)	21
1.4. Caseína	24
1.5. Peptídeos bioativos	26
2. OBJETIVOS	29
2.1. Objetivo geral	29
2.2. Objetivos específicos	29
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
Capítulo I.....	36
Resumo.....	1
1. Introdução	2
2. Material e métodos	4
2.1. Preparação do extrato proteico bruto	4
2.2. Eletroforese SDS-PAGE do látex da quixaba.....	5
2.3. Zimograma	6
2.4. Preparação da caseína caprina.....	6
2.5. Hidrólise da caseína caprina	7
2.6. Determinação do grau de hidrólise	7
2.7. Eletroforese Tricina-SDS-PAGE dos hidrolisados	9
2.8. Cromatografia líquida de alta eficiência (RP-HPLC).....	9

2.9. Atividade antimicrobiana	10
2.10. Atividade sequestradora de radicais: Método 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS).....	11
3. Resultados e discussão.....	12
3.1. Perfil proteico por SDS-PAGE e zimograma do látex de <i>S. obtusifolium</i> .	12
3.2. Grau de hidrólise (GH)	12
3.3. Análise dos hidrolisados de caseína em Tricina-SDS-PAGE	14
3.4. Cromatografia líquida de alta eficiência (RP-HPLC).....	15
3.5. Atividade antimicrobiana das frações coletadas em RP-HPLC	16
3.6. Atividade sequestradora de radicais: Método 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS).....	17
4. Conclusões.....	19
5. Agradecimentos.....	19
6. Referências	19
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	32

LISTA DE FIGURAS

Introdução

- Figura 1.** Classificação de proteases de acordo com sua região de catálise. **17**
- Figura 2.** Imagem de uma Quixabeira (*Sideroxylon obtusifolium*). **22**
- Figura 3.** Imagem de frutos maduros e de folhas da Quixabeira. **23**
- Figura 4.** Modelo de caseína micelar. **24**
- Figura 5.** Esquematização das regiões hidrofóbicas (retângulos) e hidrofílicas (“loops”) das frações de caseína e suas interações com o fosfato de cálcio (triângulos). **26**

Capítulo I

- Figura 1.** Análise do extrato bruto das proteínas do látex de *S. obtusifolium* realizada em gel de eletroforese de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (A). Zimografia em gel de gelatina das proteínas do látex de *S. obtusifolium* realizada em gel de eletroforese de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (B). **61**
- Figura 2.** Gráfico de Pareto dos efeitos principais das variáveis relação enzima:substrato, temperatura e tempo na hidrólise da caseína caprina com proteases do látex da *Sideroxylon obtusifolium*, tendo como variável resposta o grau de hidrólise. **61**
- Figura 3.** Gel de SDS-PAGE 15,4% da caseína caprina, hidrolisada em função do tempo e da temperatura, ao pH 6,5, por proteases do látex da *S. obtusifolium* nas proporções de 1:50(A); 1:150(B) e 1:100(C) relação **61**

Enzima/Substrato. PM (Padrão Molecular), CNc (Caseinato de Sódio Caprino), sendo 1 (8h-28°C), 2 (24h—28°C), 3 (8h-40°C) e 4 (24h-40°C), correspondentes as figuras 3A e 3B. A figura 3C representa os pontos centrais que apresentam as mesmas condições de hidrólise (16h-36°C).

Figura 4. Cromatografia líquida de alta eficiência (RP-HPLC) do hidrolisado (1:50, 40°C, 24h), indicando as frações coletadas (F1 a F15). **61**

LISTA DE TABELAS

Introdução

Tabela 1. Classificação das proteases de acordo com as características dos sítios ativos.	18
--	-----------

Capítulo I

Tabela 1. Matriz do planejamento fatorial 2^3 para analisar o grau de hidrólise das proteases presentes no látex da <i>Sideroxylon obtusifolium</i> .	62
Tabela 2. Grau de hidrólise da caseína caprina da raça Saanen.	62
Tabela 3. Análise de Variância para os dados obtidos no planejamento fatorial completo.	62
Tabela 4. Atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, das frações (F1-F15) coletadas através de cromatografia líquida (RP-HPLC). Concentração de 500 µg/mL. Os símbolos (+) e (-) indicam a presença ou ausência de inibição do crescimento microbiano, respectivamente.	62
Tabela 5. Atividade sequestradora do radical ABTS, das frações de peptídeos (F1-F15) hidrolisadas a partir de caseína caprina em (%). Atividade antioxidante equivalente ao Trolox (AAET), ao ácido ascórbico (AAEAA) e ao ácido gálico (AAEAG) em µM.	62

INTRODUÇÃO

Peptídeos biologicamente ativos representam atualmente, moléculas de grande interesse industrial, uma vez que, desempenham diversas funções fisiológicas dentro do organismo. Neste sentido, a caseína, apresenta-se como uma importante fonte de fornecimento destes peptídeos, os quais podem ser liberados através do processo de digestão gastrointestinal, durante o processamento de alimentos, ou através da via proteolítica de enzimas exógenas provenientes de micro-organismos ou fontes vegetais. Os peptídeos hidrolisados da caseína, com atividades biológicas, apresentam principalmente ação inibitória contra a enzima conversora de angiotensina, atividade antimicrobiana e antioxidante (BRUNO et al., 2010; WU et al., 2013).

As caseínas são responsáveis por cerca de 80% do total de proteínas presentes no leite, além de significarem de 3 à 3,5% do peso seco em comparação a todos os constituintes deste alimento. Representando uma proteína de alta qualidade nutricional, a caseína também corresponde a uma fonte rica de peptídeos com atividades biológicas, desempenhando funções importantes no sistema nervoso, cardiovascular, gastrointestinal e imune (AO; LI, 2013).

As proteases utilizadas para a degradação de substratos proteicos como a caseína podem ser obtidas de três fontes distintas, microbiana, vegetal e animal. O látex vegetal é formado por diversos constituintes orgânicos, dentre eles, resinas, ceras, compostos lipídicos, e principalmente proteínas e enzimas proteolíticas, estando associado com os mecanismos de defesa das plantas contra patógenos (COSTA et al., 2010; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2011).

Sideroxylon obtusifolium, também conhecida como quixabeira, é uma árvore nativa da Caatinga nordestina. Caracteriza-se por ser uma árvore de copa densa e ovalada. Possui folhas simples e opostas e flores discretas de coloração amarela. Esta espécie floresce durante os meses de outubro e novembro, quando há o surgimento de nova folhagem. Enquanto que os frutos amadurecem nos meses de janeiro e fevereiro, produzindo anualmente abundante quantidade de sementes viáveis, que são disseminadas pela avifauna (LORENZI; MATOS, 2002).

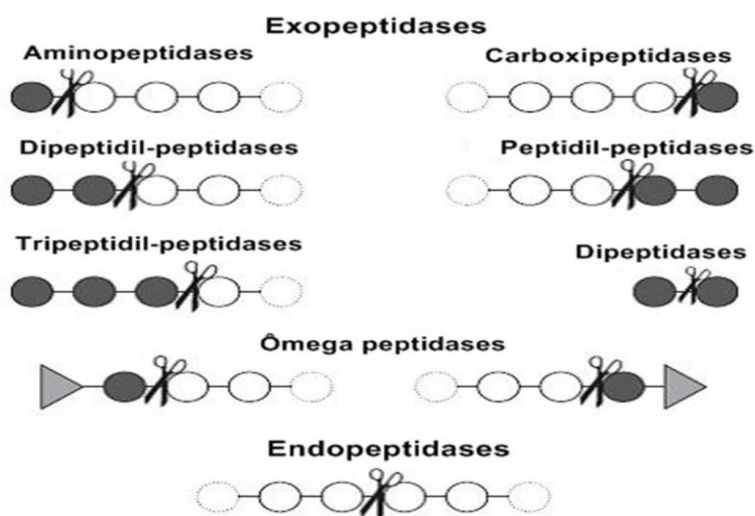
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Proteases

Proteases, ou peptidases, são enzimas responsáveis por degradar as proteínas em pequenos segmentos, por meio de clivagem das ligações peptídicas. Estas enzimas estão envolvidas em diversos processos fisiológicos, sendo consideradas moléculas críticas para o funcionamento normal de todas as células e organismos (BARRETT; RAWLINGS, 2007).

As proteases pertencem ao grupo de enzimas denominadas de hidrolases, ou seja, para que as reações ocorram e o produto seja liberado se faz necessário no meio de reação a presença da água. Durante a realização de hidrólise das ligações peptídicas, ocorre a transferência do produto formado para a água. Esse processo proteolítico resulta em uma mudança específica da função da proteína, sendo um importante mecanismo biológico (LÓPEZ-OTIN, 2002).

Estas enzimas podem ser classificadas de acordo com a sua região de catálise. Aquelas que atuam nas extremidades das cadeias polipeptídicas são denominadas de exopeptidases, em comparação as endopeptidases, as quais apresentam atividade catalítica em regiões mais internas (Figura 1). Da interação e atuação das exopeptidases sob os grupos amino-terminal e carboxi-terminal, pode-se obter a liberação de um único aminoácido, um dipeptídeo ou um tripeptídeo. Os aminoácidos próximos às ligações peptídicas cliváveis, em ambos os lados, representam o principal fator determinante para a atuação das endopeptidases (TAVANO, 2013).



Fonte: MOFFITT et al. (2010).

Figura 1. Classificação de proteases de acordo com sua região de catálise.

Além disso, as proteases são agrupadas com base no mecanismo catalítico de seu sítio ativo em classes distintas, de acordo com a especificidade da enzima aos resíduos de aminoácidos ou íons metálicos presentes. Sendo consideradas as serina proteases, treonina proteases, cisteína proteases, aspártico proteases, glutâmico proteases e metaloproteases, como apresentado na Tabela 1. Em geral, as proteases também podem ser classificadas apenas pelo seu pH ótimo, em ácidas, neutras ou alcalinas (CASTRO et al., 2011).

Estas singularidades, entre os diversos tipos de enzimas proteolíticas, torna viável a possibilidade de ativação ou inativação enzimática por pequenas moléculas específicas, que são de grande importância na pesquisa científica, assim como diversos compostos biológicos especializados, essenciais para a manutenção e equilíbrio de ação das proteases em todos os organismos vivos (YIKE, 2011).

Tabela 1. Classificação das proteases de acordo com as características dos sítios ativos.

Tipo Catalítico	Grupo Catalítico Primário	Grupo Catalítico Secundário	Exemplo
Serina	Grupo hidroxil de serina	Imidazol nitrogênio de histidina (algumas vezes grupo ϵ -amino de lisina)	Quimotripsina
Treonina	Grupo hidroxil de treonina	Grupo amino-terminal α -amino	Proteassoma
Cisteína	Grupo tiol de cisteína	Imidazol nitrogênio de histidina	Papaína
Aspártico	Grupo carboxil de dois resíduos de ácido aspártico e água ligada	—	Pepsina
Glutâmico	Grupo carboxil de glutamato	Grupo amida de glutamina	Scytalidoglutamico peptidase
Metalo	Átomos de Zinco (ou outro metal) e água ligada	Grupo carboxil de glutamato	Termolisina

Fonte: **Barrett e Rawlings, 2007 (Adaptado).**

As serina proteases correspondem a maior família de proteases existentes, estando envolvidas em diversos processos fisiológicos. Seu sítio catalítico apresenta resíduos de histidina, serina e ácido aspártico, sendo sua conformação variável de acordo com o tipo de protease. Funcionalmente, participam de reações pós-transducionais das cadeias polipeptídicas, atuando em sua maioria como

endopeptidases na ativação de zimogênios, como é o caso da tripsina (PAGE; CERA, 2008).

As treonina proteases possuem uma tríade catalítica constituída por treonina, lisina e ácido glutâmico, sendo responsáveis apenas por clivar grandes proteínas intracelulares, facilitando assim a reciclagem dos aminoácidos. Já as metalo proteases apresentam grande importância biológica do ponto de vista médico, estando envolvidas em processos como proliferação e diferenciação celular, migração e remodelagem da matriz extracelular e vascularização. Sua atividade catalítica depende da presença de íons como o zinco, podendo ser inibida se, no meio reacional houver outro tipo de íon metálico. As metalo proteases atuam geralmente como exopeptidases removendo grupos amino-terminal ou carboxi-terminal (MOFFITT et al., 2010).

As cisteína proteases estão entre as principais proteases encontradas em vírus, bactérias, protozoários, plantas e mamíferos em geral. Estas enzimas agem em sua maioria como endopeptidases, apresentando um mecanismo catalítico semelhante às serina proteases. Seu sítio catalítico é composto por um grupo sulfidrila de um resíduo de cisteína como nucleófilo, sendo sua atividade dependente de uma díade de cisteína e histidina (OLIVER-SALVADOR et al., 2011).

A presença de dois sítios ativos contendo resíduos de aspartato, com cadeias laterais carboxiladas envolvidas no processo catalítico, é uma característica fundamental das enzimas classificadas como aspártico proteases. Estas enzimas em geral apresentam atividades em condições ácidas de pH, devido seu mecanismo de catálise expressar um dos seus resíduos de aspartato protonado e o outro desprotonado inicialmente. Sendo enzimas muito utilizadas na indústria farmacêutica (SUSSMAN et al., 2013).

Enzimas da família glutâmico proteases foram recentemente descobertas, sendo a “scytalidoglutamico peptidase” a primeira enzima classificada dentro desta família. Estas enzimas apresentam uma estrutura terciária composta por duas cadeias antiparalelas e uma díade catalítica dos resíduos Glicina53 e Glutamina136, atuando biologicamente, por exemplo, sob moléculas de insulina e angiotensina (ODA, 2012).

Devido ao seu vasto potencial biotecnológico comercialmente, as proteases representam 60% do total de enzimas produzidas pela indústria, sendo utilizadas

extensivamente em diversos segmentos industriais, como no alimentício, detergentes, couro e farmacêutico. Podendo ser obtidas de três fontes distintas, microbiana, vegetal e animal (HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2011; UYAR et al., 2011).

1.2. Enzimas proteolíticas em vegetais

As proteases vegetais estão presentes em diversos processos fisiológicos envolvendo tanto em seu crescimento, como no desenvolvimento. Várias enzimas proteolíticas têm sido identificadas e estudadas a partir do látex de plantas de diversas famílias, tais como Caricaceae, Moraceae, Asclepiadaceae, Asteraceae, Apocynaceae e Euphorbiaceae (GONZÁLEZ-RÁBADE et al., 2011).

O látex vegetal é formado por diversos constituintes orgânicos, dentre eles, resinas, ceras, compostos lipídicos, e principalmente proteínas e enzimas proteolíticas, estando associado com os mecanismos de defesa das plantas contra patógenos (COSTA et al., 2010). As células laticíferas são responsáveis por sintetizar o látex vegetal, estando interligadas por estruturas ramificadas ao longo de toda a planta. Quando estas plantas são lesionadas, ocorre o processo de coagulação do látex, sendo este vital para a formação de uma barreira física contra o ataque de pragas e predadores. Durante este processo, uma série de peptídeos são liberados pela ação das proteases presentes no látex, sugerindo o envolvimento destas enzimas no processo de coagulação (GOMES et al., 2010).

Grande parte das proteases presentes no látex são classificadas como cisteína proteases e mais raramente como aspártico proteases. As cisteína, serina e treonina proteases estão envolvidas em processos de regulação da morfogênese em diferentes fases do ciclo de vida das plantas. Atrelado a isto, várias aspártico e metalo proteases participam nas respostas de defesa imunológica dos vegetais (BAE et al., 2013).

As cisteína proteases também participam de funções fisiológicas, como a senescência e germinação de sementes, processos de defesa e desenvolvimento de frutos. Entre as cerca de 800 peptidases sintetizadas pelo genoma das plantas, mais de 140 pertencem a este grupo. Além disso, dentre as plantas laticíferas de diferentes famílias, ao menos um das enzimas proteolíticas conhecidas pertencem ao grupo das cisteína ou serina proteases (TORRES et al., 2013).

Devido a sua vasta aplicabilidade e desempenho de atividade em diferentes condições de pH, tanto ácidas quanto alcalinas, as proteases de origem vegetal vem recebendo atenção especial por parte das indústrias biotecnológicas. Serina proteases de origem vegetal, por exemplo, estão sendo utilizadas por indústrias de laticínios, processamento de alimentos, indústria de cerveja, e até mesmo na biologia molecular, agindo como uma proteção contra as nucleases. Os desenvolvimentos biotecnológicos recentes, mais especificamente na área de engenharia de proteínas, pretendem em um futuro próximo melhorar as propriedades industriais e funcionais destas enzimas (MORO et al., 2013).

Proteases como a papaína, bromelina, ficina, actinidina e zingibaina, são provenientes, tanto de látex, quanto de frutos de plantas das espécies *Carica papaya*, *Ananas comosus*, *Ficus spp.*, *Actinidia deliciosa* e *Zingiber officinale*, respectivamente. Sendo enzimas classificadas como cisteína proteases e vastamente utilizadas pelas indústrias de alimentos, principalmente no processo de amaciamento de carnes (BEKHIT et al., 2014).

Enzimas proteolíticas vegetais também são utilizadas no processo de coagulação do leite para a produção de queijos. Um obstáculo na utilização destas enzimas deve-se ao fato de que algumas apresentam baixa relação entre a atividade proteolítica e o processo de coagulação do leite em comparação as proteases comercializadas, uma vez que, afetam a textura, o sabor e o rendimento dos produtos. Entretanto, outras proteases vegetais menos conhecidas comercialmente, são altamente específicas para a coagulação do leite e maturação de queijos. Como é o caso das cardosinas e ciprosinas, aspártico proteases com alta atividade coagulante, presentes no extrato de cardo, uma planta da família Asteraceae (MAZORRA-MANZANO et al., 2013).

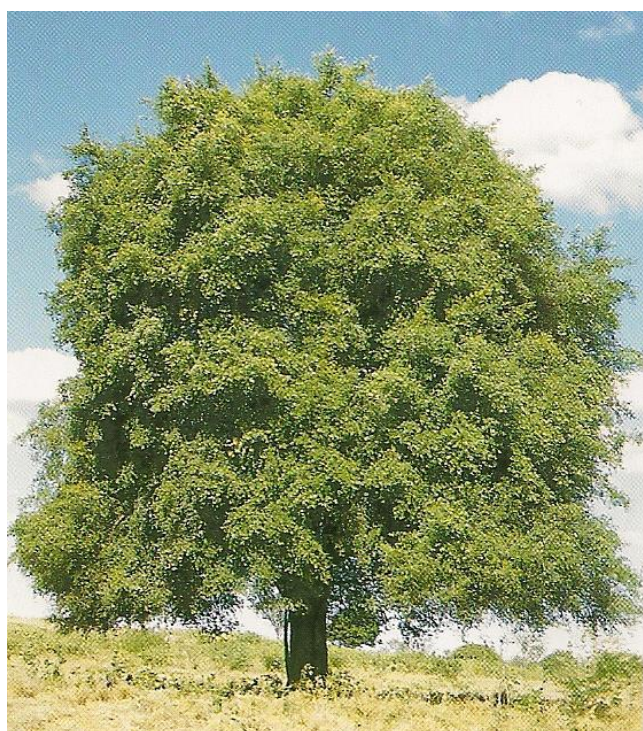
1.3. Quixabeira (*Sideroxylon obtusifolium*)

A quixabeira (*Sideroxylon obtusifolium*) pertence à família Sapotaceae, a qual é constituída de 58 gêneros e aproximadamente 1.250 espécies tropicais e subtropicais no mundo. No Brasil, foram documentados 11 gêneros e cerca de 230 espécies, sendo 86 espécies encontradas na região Nordeste do país (ALVES-ARAÚJO; ALVES, 2013).

Espécies desta família caracterizam-se pela diversidade de substâncias produzidas durante o processo de metabolismo secundário como, triterpenos,

esteroides, taninos, polifenóis, alcaloides, carotenos, compostos cianogênicos, carboidratos e ácidos graxos. Já foram descritas atividades hipoglicêmicas e anti-inflamatórias de esteroides e triterpenos isolados da *Sideroxylon obtusifolium* (BELTRÃO et al., 2008).

Sideroxylon obtusifolium, também conhecida como quixaba, quixabeira, rompegibão, coronilha, coca, sacutiaba dentre outros, é uma árvore nativa da Caatinga nordestina e do Vale do São Francisco, das restingas litorâneas e do Pantanal mato-grossense. Caracteriza-se por ser uma árvore de copa densa e ovalada, com espinhos rígidos e longos, de ramos tortuosos, com altura de 7 a 8 m (Figura 2). Seu tronco é curto, 30 a 60 cm de diâmetro e com casca áspera e acinzentada. Possui folhas simples (Figura 3) e opostas e flores discretas de coloração amarela (LORENZI e MATOS, 2002).



Fonte: Lorenzi e Matos, 2002.

Figura 2. Imagem de uma Quixabeira (*Sideroxylon obtusifolium*).

Esta espécie floresce durante os meses de outubro e novembro, quando há o surgimento de nova folhagem. Enquanto que os frutos amadurecem nos meses de janeiro e fevereiro, produzindo anualmente abundante quantidade de sementes viáveis, que são disseminadas pela avifauna. Seus frutos além de comestíveis são

vastamente procurados por pássaros e outros animais silvestres. Sua ocorrência se dá preferencialmente em solos argilosos e ricos em cálcio, apresentando distribuição predominante de forma descontínua ao longo da área que ocupa (GARRIDO et al., 2007).

A coloração dos frutos da quixabeira varia de acordo com o seu período de maturação de verde-escura até roxo-escuro (Figura 3). Após serem coletados, apresentam uma substância pegajosa e leitosa (látex), na inserção do pedúnculo à planta (SILVA et al., 2012). O fruto maduro tem cor arroxeada típica da presença de antocianina. Trata-se de um pigmento vegetal de cores variando de azul, roxa e tonalidades de vermelho encontradas em flores e frutos, presentes também em algumas folhas, caules e raízes de plantas (MARKAKIS, 1982). São compostos solúveis em água e altamente instáveis em temperaturas elevadas (SHAHIDI; NACZK, 1995). Além de contribuir para a cor de flores e frutas, as antocianinas atuam como filtro das radiações ultravioletas nas folhas (MALACRIDA; MOTTA, 2006). Em certas espécies de plantas estão associadas com a resistência aos patógenos e atuam melhorando e regulando a fotossíntese (MAZZA; MINIATI, 1993).



Fonte: Lorenzi e Matos, 2002.

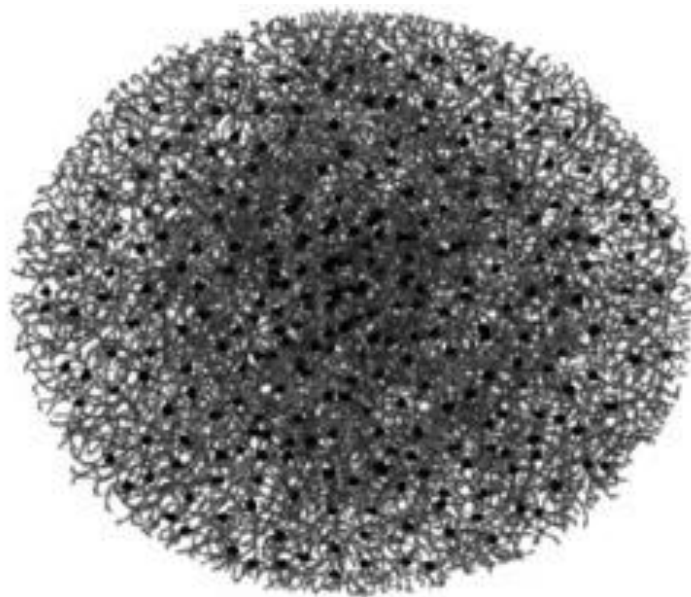
Figura 3. Imagem de frutos maduros e de folhas da quixabeira.

A quixabeira merece destaque como espécie medicinal e é utilizada no tratamento de injúrias cutâneas, gripe, gastrite, dor nos rins e inflamações (FERRAZ et al., 2006), a casca de seu tronco e das raízes é amplamente utilizada na medicina

caseira no interior do Nordeste Brasileiro. São consideradas adstringentes, tônicas, anti-inflamatórias e antidiabéticas. É usado o decocto, a infusão e a maceração da casca do caule no tratamento de inflamações ovarianas e diabetes (LORENZI e MATOS, 2002).

1.4. Caseína

As caseínas, partículas de dimensões coloidais, representam as proteínas predominantes no leite, com aproximadamente 80% deste conteúdo. Constituem um grupo heterogêneo de fosfoproteínas que estabilizam o fosfato de cálcio em estruturas micelares (Figura 4). São compostas por quatro frações principais (α_{s1} -, α_{s2} -, β - e κ -caseína). Estas micelas apresentam nano partículas de fosfato de cálcio, ligadas aos grupos fosfoserina das frações α_{s1} -, α_{s2} - e β -caseína, estando em equilíbrio com as concentrações de cálcio e fosfato presentes na fase solúvel. Além disso, a κ -caseína é responsável por formar uma camada na superfície das micelas para auxiliar no processo de estabilização (NAIR et al., 2014).



Fonte: Elzoghby et al., 2011.

Figura 4. Modelo de caseína micelar.

As frações α_{s1} - e α_{s2} -, correspondem a 40% e 10%, respectivamente, de toda a caseína presente no leite, ambas são fosfoproteínas que apresentam um grau

variável de fosforilação e altas concentrações de resíduos de prolina, que estão distribuídos ao longo da molécula. Devido a este fator, estas duas frações proteicas não apresentam nenhuma estrutura terciária definida, sendo predominantemente constituídas de estruturas secundárias significativas (α -hélice, β -folhas). Representando assim, uma estrutura mais flexível e aberta, sendo, portanto, mais sensíveis às proteases e peptidases (LISSON et al., 2014).

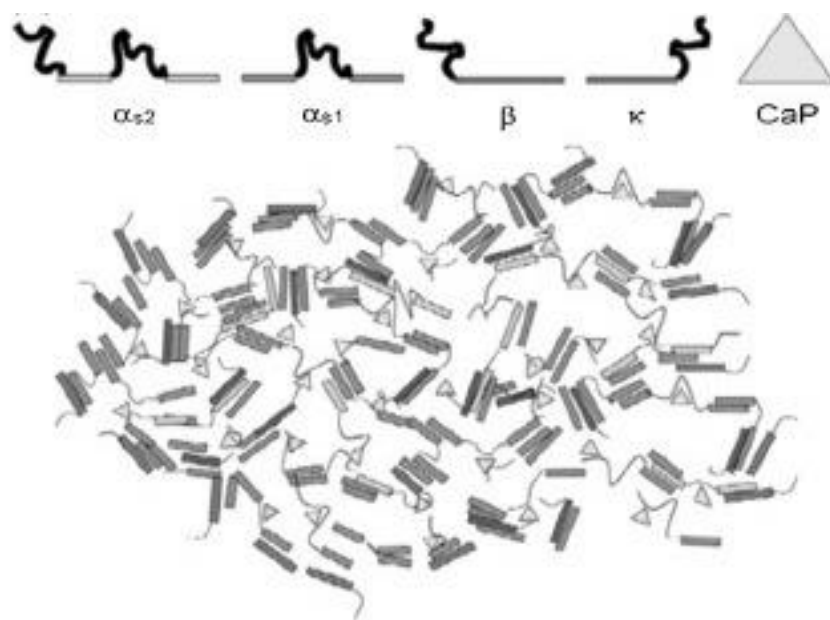
A falta de estruturas terciárias destas frações torna as caseínas mais susceptíveis à desnaturação contribuindo para sua elevada atividade de superfície, que lhes confere boa capacidade de formação de espumas e emulsões facilitando assim, a proteólise. As caseínas são parcialmente hidrofóbicas, entretanto, os resíduos hidrofóbicos, polares e carregados não se apresentam distribuídos de forma uniforme, havendo a presença de áreas hidrofóbicas e hidrofílicas ao longo da sua estrutura, tornando-as moléculas anfipáticas. Sua hidrofobicidade parcial, explica a propensão dos hidrolisados de caseína ao aparecimento de amargor (FOX, 2001).

As frações proteicas da caseína apresentam domínios hidrofóbicos e hidrofílicos distintos (Figura 5). Por exemplo, a fração α_{s1} -, apresenta um peptídeo, altamente ácido, composto por 40 aminoácidos contendo sete dos oito grupos de fosfato presentes nesta fração, além de 12 grupos carboxílicos. A região N-terminal altamente carregada da fração β - contém quatro dos cinco grupos fosfatos existentes na molécula e sete grupos carboxílicos. Já a κ -caseína, apresenta apenas um grupo fosfato e 14 grupos de ácido carboxílico localizados na região C-terminal hidrofílica de um glicomacropéptido. Essas interações entre grupos fosfatos e carboxílicos conferem o grau de hidrofobicidade das frações de caseína (ELZOGHBY et al., 2011).

Diversos modelos sobre a estrutura das micelas de caseína vêm sendo propostos ao longo dos últimos 50 anos, com base em suas propriedades químicas e físicas. Grande parte destes modelos enfatizam os papéis das interações hidrofóbicas das caseínas, bem como o papel das nanopartículas de fosfato de cálcio ligadas entre os grupos serina-fosfato das moléculas de caseína (SÁIZ-ABAJO et al., 2013).

As micelas de caseína são responsáveis por funções biológicas que incluem o transporte e fornecimento, principalmente de fosfato cálcio e proteínas. Assim como,

o provimento de aminoácidos essenciais e a formação de substâncias bioativas (YAZDI; CORREDIG, 2012).



Fonte: Elzoghby et al., 2011.

Figura 5. Esquematisação das regiões hidrofóbicas (retângulos) e hidrofílicas (“loops”) das frações de caseína e suas interações com o fosfato de cálcio (triângulos).

A baixa concentração da fração α_{s1} - da caseína caprina, em comparação à fração similar da caseína bovina corresponde ao principal fator para a substituição do leite de vaca pelo leite de cabra em lactentes e pacientes alérgicos. Esse fato está associado com o alto grau de polimorfismo genético presente na espécie caprina (HAM et al., 2010).

1.5. Peptídeos bioativos

Substâncias provenientes de alimentos, que apresentam atividades biológicas, correspondem aos nutrientes presentes nos alimentos ingeridos que podem auxiliar processos e funções regulatórias no organismo humano ou animal, independente de suas propriedades nutricionais (MEISEL et al., 1999)

A hidrólise que ocorre nas proteínas é fundamental para melhorar suas propriedades funcionais, imunológicas, sensoriais e bioativas, tornando os hidrolisados proteicos substâncias com maior valor agregado em comparação a sua proteína nativa. Sendo assim, o grau de hidrólise enzimática está diretamente

relacionado com as propriedades das proteínas que foram hidrolisadas (CHEISON et al., 2009).

A utilização de peptídeos bioativos em alimentos funcionais e bebidas, tanto para a suplementação proteica, quanto para a utilização clínica, tem aumentado significativamente. Em decorrência dos benefícios específicos de peptídeos associados à saúde, como a redução dos processos de alergia de proteínas por meio da hidrólise enzimática, nos últimos anos, a produção global de hidrolisados de proteína pelas indústrias aumentou cerca de 32% (RAO et al., 2012).

Peptídeos bioativos derivados de caseína apresentam diversas atividades biológicas, auxiliando várias funções fisiológicas dos organismos. Atividades antimicrobianas e antioxidantes, funções antitrombóticas, anti-hipertensivas e imunomoduladoras são descritas para estas moléculas. Estas substâncias são obtidas principalmente por hidrólise enzimática, sendo frequentemente adicionadas nos alimentos, visando uma melhoria funcional das suas propriedades nutricionais. Muitas enzimas como a tripsina, quimotripsina e pepsina, vêm sendo utilizadas para hidrolisar caseínas e obter peptídeos bioativos essenciais (SU et al., 2012).

Apesar da maioria dos peptídeos antimicrobianos serem derivados a partir da hidrólise da caseína, essas moléculas podem ser obtidas também por fontes diferenciadas como, por exemplo, ovos, peixes e geleia real. Um dos peptídeos antimicrobianos mais potentes descritos até agora na literatura é a lactoferricina, derivada de uma proteína do soro de leite denominada de lactoferrina (LOPÉZ-EXPÓSITO et al., 2006).

Geralmente, os peptídeos bioativos da caseína são formados de diferentes maneiras. Podem ser hidrolisados por proteases de origem microbiana, vegetal ou animal, *in vitro*, sendo suas moléculas adicionadas aos alimentos. São provenientes também, da digestão gastrointestinal *in vivo* por enzimas produzidas pelo próprio animal ou pelos micro-organismos da microbiota gastrointestinal. Ou ainda, por bactérias ácido lácticas durante o processo de fermentação de produtos derivados do leite (CHANG et al., 2013).

Os peptídeos hidrolisados da caseína, com atividades biológicas, apresentam principalmente ação inibitória contra a enzima conversora de angiotensina, atividade antimicrobiana e antioxidante. Esses peptídeos inibidores de angiotensina desempenham um importante papel fisiológico na regulação da hipertensão, pois,

uma vez que a concentração de angiotensina diminui no sistema circulatório, têm-se consequentemente uma diminuição na pressão arterial. Já os peptídeos antimicrobianos são, em sua maioria, catiônicos e contêm de 12 a 50 resíduos de aminoácidos. Estas moléculas podem retardar o crescimento de bactérias e possuem um papel importante no sistema de defesa de muitas espécies animais (WU et al., 2013).

Os peptídeos antimicrobianos apresentam diferentes comprimentos, sequência de aminoácidos, cargas aniônicas ou catiônicas e diferenças estruturais. Apesar dessas diversidades, essas moléculas possuem algumas características em comum, como por exemplo, a natureza anfipática dos seus sítios ativos. Devido as suas propriedades antimicrobianas de largo espectro, estes peptídeos foram rapidamente propostos como substâncias com ação antimicrobiana para o tratamento de infecções causadas por bactérias resistentes a antibióticos (BROGDEN; BROGDEN, 2011).

Dentre vários exemplos de peptídeos provenientes da caseína são inclusos os caseinofosfopeptídeos derivados da fração κ - (F 147-153: Glu-Ala-Ser-Pro-Glu-Val-Ile), desempenhando papel no transporte e absorção de alguns minerais e os glicomacropeptídeos que se ligam em toxinas, anulando ou amenizando seus efeitos. A israicidina, derivada da fração α_{S1} - da caseína (F 1-23: Arg-Pro-Lis-His-Pro-Ile-Lis-His-Gln-Gli-Leu-Pro-Gln-Glu-Val-Leu-Asn-Glu-Asn-Leu-Arg-Phe) apresenta funções imunomoduladoras, podendo atuar como peptídeo opióide no sistema nervoso. Portanto, os efeitos dos peptídeos bioativos são identificados dentro de sequências específicas das frações da caseína (PHELAN et al., 2009).

Peptídeos com atividades antioxidantes são capazes de inativar espécies reativas de oxigênio, eliminar os radicais livres, quelar metais, reduzir hidroperóxidos e eliminar oxidantes específicos dos alimentos. Sendo utilizados como antioxidantes potencialmente multifuncionais, conferindo um aumento do valor nutricional das dietas. Fatores como, a fonte de proteína, tipo de enzima proteolítica e do processamento da hidrólise, são determinantes na composição de aminoácidos, sequência aminoacídica e consequentemente potencial de atividade antioxidante (BAMDAD et al., 2011).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar *in vitro* o potencial antimicrobiano e antioxidante dos peptídeos obtidos a partir da hidrólise da caseína de leite caprino pelas proteases do látex da quixabeira (*Sideroxylon obtusifolium*).

2.2. Objetivos específicos

- Obter as proteases do látex dos frutos da quixabeira (*Sideroxylon obtusifolium*);
- Analisar através de zimograma o perfil das proteases obtidos do látex dos frutos da quixabeira (*Sideroxylon obtusifolium*);
- Hidrolisar as caseínas do leite caprino para obtenção dos peptídeos bioativos;
- Avaliar os peptídeos obtidos quanto as atividades antimicrobiana e antioxidante;
- Identificar o perfil dos peptídeos por cromatografia líquida de alta eficiência (RP-HPLC).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES-ARAÚJO, A.; ALVES, M. Checklist of Sapotaceae in northeastern Brazil. **Check List**, v.9(1), p.059–062, 2013.

AO, J., & LI, B. Stability and antioxidative activities of casein peptide fractions during simulated gastrointestinal digestion in vitro: Charge properties of peptides affect digestive stability. **Food Research International**, v.52, p.334–341, 2013.

BAE, C.; KIM, S.; LEE, D.J.; CHOI, D. Multiple Classes of immune-related proteases associated with the cell death response in pepper plants. **Plos One**, v.5, 2013.

BAMDAD, F.; WU, J.; CHEN, L. Effects of enzymatic hydrolysis on molecular structure and antioxidant activity of barley hordein. **Journal of Cereal Science**, v.54, p.20-28, 2011.

BARRETT, A.J.; RAWLINGS, N.D. Proteases. **Encyclopedia of Life Sciences**, 2007.

BEKHIT, A.E.D.A.; HOPKINS, D.L.; GEESINK, G.; BEKHIT, A.A.; FRANKS, P. Exogenous proteases for meat tenderization. **Food Science and Nutrition**, v.54, p.1012-1031, 2014.

BELTRÃO, A.E.S.; TOMAZ, A.C.A.; BELTRÃO, F.A.S.; MARINHO, P. *In vitro* biomass production of *Sideroxylon obtusifolium* (Roem & Schult). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.18, p.696-698, 2008.

BROGDEN, N.K.; BROGDEN, K.A. Will new generations of modified antimicrobial peptides improve their potential as pharmaceuticals? **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.38, p.217– 225, 2011.

CASTRO, H.C.; ABREU, P.A.; GERALDO, R.B.; MARTINS, R.C.A.; SANTOS, R.; LOUREIRO, N.I.V.; CABRAL, L.M.; RODRIGUES, C.R. Looking at the proteases

from a simple perspective. **Journal of Molecular Recognition**, v.24, p.165-181, 2011.

CHANG, O.K.; SEOL, K.H.; JEONG, S.G.; OH, M.H.; PARK, B.Y.; PERRIN, C.; HAM, J.S. Casein hydrolysis by *Bifidobacterium longum* KACC91563 and antioxidant activities of peptides derived therefrom. **Journal Dairy of Science**, v.96, p.1–12, 2013.

CHEISON, S.C.; ZHANG, S.B.; WANG, Z.; XU, S.Y. Comparison of a modified spectrophotometric and the pH-stat methods for determination of the degree of hydrolysis of whey proteins hydrolysed in a tangential-flow filter membrane reactor. **Food Research International**, v.42, p.91–97, 2009.

COSTA, J.O.; FONSECA, K.C.; GARROTE-FILHO, M.S.; CUNHA, C.C.; FREITAS, M.V.; SILVA, H.S.; ARAÚJO, R.B.; PENHA-SILVA, N.; OLIVEIRA, F. Structural and functional comparison of proteolytic enzymes from plant latex and snake venoms. **Biochimie**, v.92, p.1760-1765, 2010.

ELZOGHBY, A.O.; EL-FOTOH, W.S.A.; ELGINDY, N.A. Casein-based formulations as promising controlled release drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v.153, p.206–216, 2011.

FERRAZ, J.S.; ALBUQUERQUE, U.P.; MEUNIER, I.M.J. Valor de uso e estrutura da vegetação lenhosa às margens do riacho do Navio, Floresta, PE, Brasil. **Acta Botânica Brasílica**, v.20, p.125-134, 2006.

FOX, P.F. Milk proteins as food ingredients. **International Journal of Dairy Technology**. Huntingdon, v.54, p.41-55. 2001.

GARRIDO, M.S.; SOARES, A.C.F.; SOUSA, C.S.; CALAFANTE, P.L.P. Características física e química de frutos de quixaba (*Sideroxylon obtusifolium* Penn.). **Revista Caatinga**, v.20, p.34-37, 2007.

GOMES, M.T.R.; RIBEIRO, H.A.; LOPES, M.T.P.; GUZMAN, F.; SALAS, C.E. Biochemical comparison of two proteolytic enzymes from *Carica candamarcensis*: Structural motifs underlying resistance to cystatin inhibition. **Phytochemistry**, v.71, p.524–530, 2010.

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

HAM, J.S.; LEE, S.G.; JEONG, S.G.; OH, M.H.; KIM, D.H.; PARK, Y.W. Characteristics of Korean-Saanen goat milk caseins and somatic cell counts in comparison with Holstein cow milk counterparts. **Small Ruminant Research**, v.93, p.202–205, 2010.

HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, R.; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, G.; BERGMANN, C.W.; LOERA-CORRAL, O.; ROJO-DOMÍGUEZ, A.; HUERTA-OCHOA, S.; REGALADO GONZÁLEZ, C.; PRADO-BARRAGÁN, L.A. Purification and characterization of a thermodynamic stable serine protease from *Aspergillus fumigatus*. **Process Biochemistry**, v.46, p.2001–2006, 2011.

LISSON, M.; LOCHNIT, G.; ERHARDT, G. In vitro gastrointestinal digestion of bovine α_{S1} - and α_{S2} -casein variants gives rise to different IgE-binding epitopes. **International Dairy Journal**, v.34, p.47-55, 2014.

LOPÉZ-EXPÓSITO, I.; GÓMEZ-RUIZ, J.A.; AMIGO, L.; RECIO, I. Identification of antibacterial peptides from ovine α_{S2} -casein. **International Dairy Journal**, v.16, p.1072–1080, 2006.

LÓPEZ-OTIN, C.; OVERALL, C.M. Protease degradomics: a new challenge for proteomics. Nature Reviews. **Molecular Cell Biology**, v.3, p.509-519, 2002.

LORENZI, H.; MATOS, J. A. Plantas medicinais no Brasil. Nativas e Exóticas. **Nova Odessa: Instituto Plantarum**, p. 432-433, 2002.

MALACRIDA, C.R.; MOTTA, S. Antocianinas em suco de uva: composição e estabilidade. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v.24, p.59-82, 2006.

MARKAKIS, P. Anthocyanins in color foods. **New York, Academic Press**. p.163-180, 1982.

MAZORRA-MANZANO, M.A.; PEREA-GUTIERRÉZ, T.C.; LUGO-SÁNCHEZ, M.E.; RAMIREZ-SUAREZ, J.C.; TORRES-LLANEZ, M.J.; GONZÁLEZ-CÓRDOVA, A.F.; VALLEJO-CORDOBA, B. Comparison of the milk-clotting properties of three plant extracts. **Food Chemistry**, v.141, p.1902-1907, 2013.

MAZZA, G.; MINIATI, E. Anthocyanins in fruits, vegetables and grains. **CRC Press, Boca Raton**, pp. 1–28, 1993.

MEISEL, H. Bioactive substances of food origin: a challenge for food and nutrition science. **Nahrung Weinheim**, v.43, n.3, p.147, 1999.

MOFFITT, K.L.; MARTIN, L.; WALKER, B. Proteases implicated in apoptosis: old and new. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.62, p.563–576, 2010.

MORO, L.P.; CABRAL, H.; OKAMOTO, D.N.; HIRATA, I.; JULIANO, M.A.; JULIANO, L.; BONILLA-RODRIGUEZ, G.O. Characterization, subsite mapping and N-terminal sequence of miliin, a serine-protease isolated from the latex of *Euphorbia milii*. **Process Biochemistry**, v.48, p.633–637, 2013.

NAIR, P.K.; ALEXANDER, M.; DALGLEISH, D.; CORREDIG, M. Physico-chemical properties of casein micelles in unheated skim milk concentrated by osmotic stressing: Interactions and changes in the composition of the serum phase. **Food Hydrocolloids**, v.34, p.46-53, 2014.

ODA, K. New families of carboxyl peptidases: serine-carboxyl peptidases and glutamic peptidases. **Journal of Biochemistry**, v.151(1), p.13–25, 2012.

OLIVER-SALVADOR, M.C.; LIAN, Z.; LAURSEN, R.A.; BOLAÑOS-GARCÍA, V.M.; SORIANO-GARCÍA, M. Biochemical characterisation of MX-4, a plant cysteine protease of broad specificity and high stability. **Food Chemistry**, v.126, p.543–552, 2011.

PAGE, M.J.; DI CERA, E. Serine peptidases: Classification, structure and function. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.65, p.1220-1236, 2008.

PHELAN, M.; AHERNE, A.; FITZGERALD, R.J.; O'BRIEN, M. Casein-derived bioactive peptides: Biological effects, industrial uses, safety aspects and regulatory status. **International Dairy Journal**, v.19, p.643–654, 2009.

RAO, S.Q.; JU, T.; SUN, J.; SU, Y.J.; XU, R.R.; YANG, Y.J. Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from enzymatic hydrolysate of hen egg white lysozyme. **Food Research International**, v.46, p.127–134, 2012.

SÁIZ-ABAJO, M.J.; GONZÁLEZ-FERRERO, C.; MORENO-RUIZ A.; ROMO HUALDE, A.; GONZÁLEZ-NAVARRO, C.J. Thermal protection of b-carotene in re assembled casein micelles during different processing technologies applied in food industry. **Food Chemistry**, v.138, p.1581–1587, 2013.

SHAHIDI, F., NACZK, M. Food Phenolics: Sources, Chemistry, Effects, Applications. **Technomic Publishing Company, Incorporated**, pp.321, 1995.

SILVA, K.B.; ALVES, E.U.; BRUNO, R.L.A.; MATOS, V.P. Caracterização morfológica de frutos, sementes e germinação de *Sideroxylon obtusifolium* (Roem. e Schult.) Penn. (SAPOTACEAE). **Revista Árvore**, v.36, p.59-64, 2012.

SU, R.; LIANG, M.; QI, W.; LIU, R.; YUAN, S.; HE, Z. Pancreatic hydrolysis of bovine casein: Peptide release and time-dependent reaction behavior. **Food Chemistry**, v.133, p.851–858, 2012.

SUSSMAN, F.; VILLAVERDE, M.C.; DOMÍNGUEZ, J.L.; DANIELSON, U.H. On the active site protonation state in aspartic proteases: implications for drug design. **Current Pharmaceutical Design**, v.19, p.4257-4275, 2013.

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

TORRES, M.J.; TREJO, S.A.; NATALUCCI, C.L.; LÓPEZ, L.M.I. Biochemical characterization of VQ-VII, a cysteine peptidase with broad specificity, isolated from *Vasconcellea quercifolia* latex. **Planta**, v.237, p.1651-1659, 2013.

UYAR, F.; PORSUK, I.; KIZIL, G.; YILMAZ, E.I. Optimal conditions for production of extracellular protease from newly isolated *Bacillus cereus* strain CA15. **EurAsian Journal of BioSciences**, v.5, p.1-9, 2011.

WU, S.; QI, W.; LI, T.; LU, D.; SU, R.; HE, Z. Simultaneous production of multi functional peptides by pancreatic hydrolysis of bovine casein in an enzymatic membrane reactor via combinational chromatography. **Food Chemistry**, v.141, p.2944–2951, 2013.

YAZDI, S.R.; CORREDIG, M. Heating of milk alters the binding of curcumin to casein micelles. A fluorescence spectroscopy study. **Food Chemistry**, v.132, p.1143–1149, 2012.

YIKE, I. Fungal Proteases and Their Pathophysiological Effects. **Mycopathologia**, v.171, p.299–323, 2011.

Capítulo I

Atividade antimicrobiana e antioxidante de peptídeos derivados de caseína caprina hidrolisada com proteases do látex da *Sideroxylon obtusifolium*

**Submetido à revista:
International Dairy Science**



Atividade antimicrobiana e antioxidante de peptídeos derivados de caseína caprina hidrolisada com proteases do látex da *Sideroxylon obtusifolium*

José Erick Galindo Gomes^a, Alana Emília Soares de França Queiroz^a, Talita Camila Evaristo da Silva Nascimento^a, Renato José Reis Molica^a, Keila Aparecida Moreira^{a*}

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

Autor para correspondência: moreirakeila@hotmail.com

Resumo

A caseína caprina foi hidrolisada por proteases do látex da *Sideroxylon obtusifolium* para obtenção de peptídeos com atividade antimicrobiana e antioxidante. A eletroforese e o zimograma do extrato enzimático revelaram a presença de quatro proteínas com massas moleculares distintas e duas enzimas proteolíticas maiores que 30 kDa. A caseína caprina foi hidrolisada utilizando planejamento estatístico fatorial 2³, totalizando 12 ensaios, avaliando como efeitos a relação enzima/substrato, tempo de hidrólise e temperatura. O grau de hidrólise (GH) máximo de 35,086±0,56%, foi obtido no ensaio 7 (1:50, 24h, 40 °C). Os hidrolisados foram analisados quanto à massa molecular inicialmente por eletroforese Tricina-SDS-PAGE, sendo observados peptídeos menores que 4 kDa. Das frações coletadas em RP-HPLC um total de 15 apresentaram atividades antimicrobiana e antioxidante. A atividade antimicrobiana frente as bactérias Gram-negativas e Gram-positivas ocorreu em 9 frações analisadas. Os maiores resultados de atividade antioxidante pelo sequestro do radical ABTS⁺, foram de 50,884±0,42% e 51,980±0,17%.

Abstract

The goat casein was hydrolyzed by proteases latex *Sideroxylon obtusifolium* to obtain peptides with antimicrobial and antioxidant activity. Electrophoresis and zymogram of the enzyme extract revealed the presence of four proteins with different molecular weights and proteolytic enzymes larger than 30 kDa. The goat casein was hydrolyzed using 2³ factorial statistical design, totaling 12 trials evaluating effects as the enzyme/substrate hydrolysis time and temperature relationship. The maximum degree of hydrolysis (DH) of 35.09±0.56% was obtained in the test 7 (1:50, 24 h, 40 °C). The hydrolysates were analyzed for molecular weight by electrophoresis initially Tricine-SDS-PAGE, peptides smaller than 4 kDa are observed. Fractions collected from RP-HPLC showed a total of 15 antimicrobial and antioxidant activities. The antimicrobial activity against Gram-negative and Gram-positive bacteria occurred in 9 fractions analyzed. The major results of antioxidant activity by sequestration radical ABTS⁺⁺ were 50.884±0.42% and 51.980±0.17%.

1. Introdução

O látex vegetal corresponde a uma fonte de proteases produzidas por células laticíferas em várias famílias de plantas, tais como Apocynaceae, Caricaceae, Euphorbiaceae, Sapotaceae e Moraceae, sendo a maioria destas proteases classificadas como cisteína ou serina e mais raramente como aspártico proteases (SHIVAPRASAD et al., 2010; SIRITAPETAWEET et al., 2012).

Enzimas proteolíticas provenientes de plantas, apresentam grande interesse industrial e biotecnológico, devido ao seu potencial proteolítico em diferentes valores de temperatura e pH. Estas enzimas são responsáveis por diversos processos fisiológicos nas plantas, como por exemplo, a germinação de

sementes, mecanismos de defesa, senescência e ativação de proenzimas (RAWDKUEN et al., 2011).

Sideroxylon obtusifolium é uma planta laticífera nativa da região de Caatinga do Nordeste brasileiro e é membro da família Sapotaceae, sendo conhecida popularmente como quixaba. A sua ocorrência se dá preferencialmente em solos argilosos ricos em cálcio, apresentando uma distribuição predominantemente descontínua ao longo da área que ocupa, além de ser considerada uma planta com propriedades medicinais (SILVA et al., 2013).

A caseína, que representa 80% do conteúdo proteico do leite, está presente na forma de agregados supramoleculares denominados de micelas de caseína, sendo composta por quatro frações principais, α_{s1} -, α_{s2} -, β - e κ -caseína (YAZDI; CORREDIG, 2012). Além de representar uma proteína de alta qualidade nutricional, a caseína também corresponde a uma fonte rica de peptídeos com atividades biológicas, desempenhando funções importantes no sistema nervoso, cardiovascular, gastrointestinal e imune (AO; LI, 2013).

Peptídeos liberados a partir da hidrólise da caseína apresentam diversas propriedades biológicas, como atividade anti-hipertensiva, antimicrobiana, antioxidante, além de propriedades opióides, podendo desempenhar funções antagonistas no sistema nervoso (JIANG et al., 2013).

A maioria dos peptídeos antimicrobianos apresenta geralmente de 12 a 50 resíduos de aminoácidos, incluindo dois ou mais resíduos de aminoácidos carregados positivamente. A interação entre os peptídeos bioativos com as membranas e parede celular das bactérias, ocorre através dos resíduos catiônicos das cadeias laterais destes peptídeos, compostas por resíduos de lisina, arginina e histidina (BARZYK et al., 2009).

Estes resíduos podem interagir também com lipopolissacarídeos, sendo esta capacidade de se associar com as células e seu citoesqueleto, uma característica dos peptídeos antimicrobianos. Tem sido demonstrado que alguns peptídeos antimicrobianos de cadeias mais longas são mais eficientes em cessar o crescimento de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, em comparação com aqueles de cadeias menores (ARRUDA et al., 2012).

Além das propriedades antimicrobianas, os peptídeos bioativos podem apresentar propriedades antioxidantes como, redução dos níveis de espécies reativas de oxigênio e radicais livres, causadores de danos nas moléculas de DNA, alergias e envelhecimento. Neste caso, peptídeos provenientes da proteína do leite, podem proporcionar um suplemento de moléculas antioxidantes para reduzir tais danos (CHANG et al., 2013).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial antimicrobiano e antioxidante dos peptídeos liberados durante a hidrólise da caseína caprina, por proteases do látex presente nos frutos da *Sideroxylon obtusifolium*.

2. Material e métodos

2.1. Preparação do extrato proteico bruto

Os frutos frescos de *S. obtusifolium* foram lavados quatro vezes com água destilada e desinfetados com hipoclorito de sódio 10% (v/v). Posteriormente, o látex foi coletado destes frutos por gotejamento e diluído na proporção de 1g para 100 ml de tampão fosfato 0,1M, pH 6,0. Esta mistura foi agitada durante 1 h a 24 °C para acelerar o processo de solubilização, filtrada em papel filtro e armazenada em freezer a -20 °C. O extrato enzimático filtrado foi usado para

determinação da proteína total, atividade proteásica, hidrólise da caseína e consequentemente, obtenção dos peptídeos.

2.2. Eletroforese SDS-PAGE do látex da quixaba

As amostras para a eletroforese foram preparadas utilizando a quantidade de 100µg/mL do extrato vegetal, em tampão de amostra contendo 50% (v/v) de água deionizada, 12,5% (v/v) de tampão Tris-HCl 0,5M, pH 6,8; 10% (v/v) de glicerol; 20% (v/v) de dodecil sulfato de sódio à 10% (p/v); 5% (v/v) de β -mercaptoetanol e 2,5% (v/v) de azul de bromofenol à 2% (p/v). A eletroforese SDS-PAGE das proteínas do látex da quixaba transcorreu segundo Laemmli (1970), sendo um volume de 10µL carregado em gel de poliacrilamida com concentração de 4% em tampão Tris-HCl 0,125M pH 6,8, e gel de separação de 15% de poliacrilamida em tampão Tris-HCl 0,37M, pH 8,8. O padrão de massa molecular (LMW Calibration Kit For SDS Electrophoresis) da GE Healthcare, foi composto por fosforilase b (97 kDa), albumina (66 kDa), ovalbumina carbônica (45 kDa), anidrase (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactalbumina (14,4 kDa). A corrida das amostras foi realizada a 4 °C, 179V, 25mA e 4W, sendo a temperatura mantida em banho termostatizado. O gel foi corado em solução contendo 0,25% (p/v) de Coomassie Brilliant Blue R-250, dissolvido em uma solução a 45% (v/v) de metanol e 10% de ácido acético, durante 120 minutos. A descoloração foi realizada durante 24 horas em solução de a (v/v) de metanol e 10% (v/v) de ácido acético. As bandas foram detectadas através da coloração de prata (PlusOne, Silver Staining kit, Protein) da GE Healthcare (Uppsala, Suécia).

2.3. Zimograma

A atividade enzimática das proteases do látex dos frutos da quixaba foi determinada por zimografia, segundo a metodologia proposta por Egito et al. (2007), com modificações. A quantidade de 3mg do extrato vegetal bruto, foi adicionado para 1mL do tampão Tris-HCl 0,125 mM, pH 6,8, contendo 5% (p/v) SDS, 1% (p/v) de sacarose, e 0,05% (p/v) de azul de bromofenol. O volume de 10µL da solução foi carregado em gel de SDS-PAGE, contendo 0,1% (p/v) de gelatina. A eletroforese (SDS-PAGE) ocorreu em um gel de concentração de 4,9% de poliacrilamida em tampão Tris-HCl 0,125M, pH 6,8 e gel de separação de 13,4% de poliacrilamida em tampão Tris-HCl 0,37M, pH 8,8. A corrida das amostras no gel foi realizada a 4 °C, 159V, 25mA durante 114 minutos. Após a migração eletroforética o gel foi lavado por duas vezes com Triton X-100 a 2% (v/v) por 30 minutos. Posteriormente incubado a 37 °C durante 48 horas na presença de tampão Tris-HCl 0,05M, pH 7,5, para proceder a reação de hidrólise. A coloração do gel foi realizada utilizando uma solução composta por uma mistura de etanol a 40% (v/v), 10% (v/v) de ácido acético e Coomassie Brilliant Blue R-250 0,1% (p/v), durante 60 minutos. Transcorrido este período, o gel foi descorado com solução contendo 30% (v/v) de etanol e 7,5% (v/v) de ácido acético, sob agitação.

2.4. Preparação da caseína caprina

O leite cru foi obtido de um rebanho leiteiro de cabras da raça Saanen (Município de Arcoverde, estado de Pernambuco, Brasil) e imediatamente armazenado a 4 °C. O processo de obtenção da caseína caprina ocorreu através da metodologia proposta por Egito et al. (2006), com modificações. Sendo o leite desnatado por centrifugação (2100 x g por 30min a 32 °C) e a caseína total

147 preparada mediante precipitação isoelétrica em pH 4,2 com HCl 1M, e o
148 precipitado obtido pela centrifugação a 2200 x g por 20min, a 10 °C. O
149 precipitado foi lavado três vezes com água destilada, sendo solubilizado em pH
150 7,0 através da adição de NaOH 1M. Esse ciclo de precipitação-lavagem-
151 dissolução se repetiu por mais duas vezes. O precipitado de caseína foi dialisado
152 com água deionizada a 4 °C, por 72h e a solução de caseína liofilizada e
153 estocada a -20 °C.

154 **2.5. Hidrólise da caseína caprina**

155 A caseína caprina, dissolvida para uma concentração de 10mg/mL em
156 tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 6,5, foi hidrolisada, seguindo a metodologia
157 proposta por Egito et al. (2007). O extrato enzimático obtido do látex dos frutos
158 da *Sideroxylon obtusifolium* foi diluído na proporção de 1:100 em tampão fosfato
159 de sódio 0,1M, pH 6,0. A hidrólise ocorreu de acordo com uma matriz de
160 planejamento fatorial 2^3 (Tabela 1), havendo variação na proporção
161 Enzima/Substrato (E/S), temperatura e tempo de hidrólise, com o intuito de
162 verificar as melhores condições de atuação da enzima. Após a hidrólise, a
163 reação enzimática foi interrompida por choque térmico, sendo as amostras
164 submetidas a 100 °C durante 10 minutos para a desnaturação das proteases.

165 **2.6. Determinação do grau de hidrólise**

166 O grau de hidrólise, definido como a quantidade de ligações peptídicas
167 clivadas, ou o número de grupos amino formados durante o processo de
168 hidrólise, foi determinado de acordo com a metodologia proposta por Adler-
169 Nissen (1979), utilizando o ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (TNBS). Para a
170 reação, 250 µL das amostras do hidrolisado de caseína, foram incubados com 2

mL tampão fosfato de sódio, 0,2125M, pH 8,2 e 2 mL do TNBS 0,1% (v/v) diluído em água ultra pura. A reação ocorreu à 50 °C durante 60 minutos. Transcorrido este período, foram adicionados 4 mL de HCl 0,1N para interromper a reação. A mistura reacional foi mantida em temperatura ambiente durante 30 minutos, sendo analisada em espectrofotômetro a 340nm. A curva de calibração foi realizada utilizando L-leucina como aminoácido padrão, variando as concentrações entre 0,25 – 8 mM. O GH (%) foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$GH(\%) = \left(\frac{AN_2 - AN_1}{N_{pb}} \right) * 100$$

Onde, AN₁ corresponde ao conteúdo de nitrogênio amino antes da hidrólise em mg/g de proteína, AN₂ corresponde ao conteúdo de nitrogênio amino depois da hidrólise em mg/g de proteína. E N_{pb}, correspondem ao conteúdo total de nitrogênio amino presente contido nas ligações peptídicas do substrato proteico. Vale salientar que os valores de AN₁ e AN₂ foram obtidos com base na curva padrão gerada com L-leucina, e N_{pb}, de acordo com a metodologia de Micro-Kjeldahl (AOAC, 1990).

A análise estatística, tendo como variável resposta o grau de hidrólise dos ensaios, foi realizada por meio da Análise de Variância (ANOVA), utilizando o software Statistica 7.0, para verificar as variáveis com efeitos estatisticamente significativos (p<0,1) e o ajuste do modelo aos dados experimentais. Além disso, para a comparação de médias utilizou-se o Teste de Tukey com nível de 5% de probabilidade, através do programa SISVAR (FERREIRA, 2000). Todos os ensaios foram realizados em ordem aleatória.

2.7. Eletroforese Tricina-SDS-PAGE dos hidrolisados

As amostras para a eletroforese foram preparadas utilizando a quantidade de 40µL de cada solução dos hidrolisados e 960µL de tampão de amostra composto por 40% (v/v) de água deionizada, 20% (v/v) de tampão Tris-HCl 0,5M, pH 6,8, 24% (v/v) de glicerol, 10% (v/v) de dodecil sulfato de sódio à 10%, 2% (v/v) de β-mercaptoetanol e 4% (v/v) de Coomassie Brilliant Blue G-250 à 0,5%. A eletroforese SDS-PAGE dos hidrolisados e do caseinato não hidrolisado transcorreu segundo Laemmli (1970). A corrida das amostras no gel foi realizada a 4 °C, 201V, 25mA e 5W, sendo a temperatura mantida em banho termostatzado. O gel foi submetido ao processo de coloração, sendo utilizada uma solução fixadora com 40% (v/v) de metanol e 10% (v/v) de ácido acético, durante 30 minutos. Posteriormente, o gel foi corado com uma solução contendo 10% (v/v) de ácido acético e 0,25g (p/v) de Coomassie Brilliant Blue G-250, durante 1 hora e descorado em uma solução de 10% (v/v) de ácido acético. As bandas foram detectadas através da coloração de prata (PlusOne, Silver Staining kit, Protein) da GE Healthcare (Uppsala, Suécia).

2.8. Cromatografia líquida de alta eficiência (RP-HPLC)

A identificação dos peptídeos foi realizada utilizando uma coluna C18 analítica de 25cm (250 x 4,6mm de diâmetro interno, 5µm de tamanho de partícula, 10nm porosidade, Phenomenex, EUA) conectada ao HPLC modelo LC 20A Prominence, Shimadzu, Japão. A caseína caprina não hidrolisada usada como padrão, assim como a solução de peptídeos hidrolisados, foi diluída em água ultra pura e injetado 100µl. A cromatografia foi realizada segundo a metodologia proposta por Ghassem et al. (2012) com modificações, utilizando como eluente A água ultra pura contendo 0,1% (v/v) de ácido trifluoroacético e como eluente B

acetonitrila na presença de 0,1% (v/v) de ácido trifluoroacético, em gradiente linear. O comprimento de onda para a detecção foi de 214nm com o detector de rede de fotodiodo modelo SPD-M20A (Shimadzu) com um fluxo de 1,0 mL/min.

2.9. Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana das frações de peptídeos coletadas através da cromatografia líquida de alta eficiência foi realizada pelo método de turbidez descrito por Mine et al. (2004) com modificações. Sendo utilizadas três bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* UFPEDA 02, *Enterococcus faecalis* UFPEDA 138 e *Bacillus subtilis* UFPEDA 86) e três Gram-negativas (*Escherichia coli* UFPEDA 224, *Klebsiella pneumoniae* UFPEDA 396 e *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 416), adquiridas da Coleção de Culturas do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil.

Para a determinação da atividade antimicrobiana, as colônias de bactérias foram ativadas em 10 mL de caldo triptona de soja (TSB) e incubadas a 37 °C durante 15 horas. A suspensão de cada bactéria foi inoculada em caldo TSB até atingir escala logarítmica de crescimento determinada por absorbância a 620nm e padronizada uma quantidade de 10⁸ UFC/mL. Microplacas de 96 poços de fundo plano, de poliestireno e estéreis (Corning®), foram utilizadas para o ensaio. A mistura de 50µL de cada fração de peptídeos foi realizada com 45µL de caldo Mueller Hinton (CMH) e 5µL da suspensão bacteriana. O controle positivo apresentou apenas CMH e suspensão bacteriana. Já no controle negativo utilizou-se cloranfenicol na concentração de 300µg/mL. Após a incubação das placas a 37 °C durante 24 horas procedeu-se a leitura utilizando leitora de microplaca Asys UVM 340 (Biochrom, Cambridge, Reino Unido) a 620nm.

2.10. Atividade sequestradora de radicais: Método 2,2'- azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS)

A atividade sequestradora de radicais livres das frações de peptídeos foi determinada usando o radical cátion ABTS⁺, gerado a partir do 2,2'- azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS) de acordo com Re et al. (1999) modificada. Para formação do radical ABTS⁺, persulfato de potássio e ABTS foram preparados a uma concentração final de 2,45 e 7 mM, respectivamente, e incubado ao abrigo da luz por 16 h a temperatura ambiente. A absorbância da solução do radical foi ajustada para 0,70 ± 0,02 a 734 nm, usando espectrofotômetro Libra S22 (Biochrom®, Áustria), por diluição em tampão fosfato-salino 100 mM (PBS), pH 7,4. Para a reação, 50 µL das amostras foram misturados com 950 µL da solução do radical ABTS⁺. Os ensaios foram incubados a 30 °C durante seis minutos e lidos a 734 nm, e em triplicata. Três curvas padrão de substâncias antioxidantes conhecidas, Trolox (1-1000 µM), ácido ascórbico (1-1000 µM) e ácido gálico (1-300 µM) foram preparadas, para avaliar a eficiência dos peptídeos bioativos obtidos. A atividade antioxidante (%) foi calculada em relação à atividade de eliminação do radical, de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Atividade antioxidante (\%)} = \left(\frac{A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controle}}} \right) \times 100$$

Onde, A_{controle} representa a absorbância inicial do ABTS; sendo expressa também em atividade antioxidante equivalente ao Trolox (AAET), ao ácido ascórbico (AAEAA) e ao ácido gálico (AAEAG), calculada através das equações geradas a partir de suas respectivas curvas padrões e expressas em µM.

3. Resultados e discussão

3.1. Perfil proteico por SDS-PAGE e zimograma do látex de *S. obtusifolium*

Avaliando o perfil eletroforético das proteínas presentes deste látex, pode-se observar na Figura 1A, a presença de quatro bandas distintas. Sendo duas bandas mais densas com massa molecular menor que 30kDa e outras duas bandas menos densas, maiores que 45kDa. Ao submeter o látex dos frutos da quixaba à técnica da zimografia (Figura 1B), observa-se que as proteínas que apresentam atividade proteolítica são àquelas correspondentes as bandas menos densas, ou seja, aquelas que apresentam uma maior massa molecular (>45kDa).

A diversidade de enzimas proteolíticas presentes em extratos de origem vegetal estimula diretamente a busca de novas proteases destas fontes. Egito et al. (2007) trabalhando com proteases provenientes de flores de girassol e sementes de albizia observaram que as proteases presentes nestes dois extratos vegetais apresentou massas moleculares em torno de 97kDa. Enquanto que, Shivaprasad et al. 2010, trabalhando com látex de *Pergularia extensa* observou a presença de uma única protease com massa molecular de 23,356kDa, demonstrando assim a variedade de proteases em diferentes extratos vegetais.

3.2. Grau de hidrólise (GH)

O planejamento fatorial completo baseado no modelo de primeira ordem envolve a triagem de um grande número de variáveis que podem influenciar a resposta a ser avaliada em poucos ensaios. Um conjunto de 12 experimentos,

com quatro pontos centrais e envolvendo três variáveis independentes, foi realizado para identificar quais variáveis afetaram significativamente o GH da caseína caprina, podendo ser observada uma grande variação para este parâmetro (Tabela 2).

Analisando estatisticamente o GH da caseína caprina pelas proteases do látex da *S. obtusifolium*, se observou que a hidrólise enzimática dentro do planejamento fatorial demonstrou a maior eficiência catalítica aos 40 °C, sendo os melhores resultados equivalentes aos ensaios 7 e 8. No entanto, estes ensaios não diferiram entre si ao nível de 5 % de probabilidade pelo Teste de Tukey. Apesar de estes ensaios apresentarem resultados bastante similares, o ensaio 7, além de apresentar o melhor resultado para o GH, ainda possui a vantagem do uso de uma menor quantidade de substrato (1:50), em comparação ao ensaio 8 (1:150), tornando-o mais vantajoso para utilizações industriais

A significância da equação do modelo (Equação 1) foi avaliada pela Análise de Variância (Tabela 3), mostrando que a regressão foi significativa no campo experimental analisado. O coeficiente de determinação (R^2) foi 0,87, ou seja, 87% da variação total da resposta podem ser explicados pelo modelo estatístico.

$$\begin{aligned} \text{Grau de Hidrólise da caseína caprina (\%)} = & -40,91 (\pm 5,981) + 1,12 \cdot \text{E/S} (\pm 0,041) \\ & + 0,43 \cdot \text{T} (\pm 0,168) - 6,44 \cdot \text{TH} (\pm 0,257) - 0,03 \cdot \text{E/S} \cdot \text{T} (\pm 0,001) - 0,017 \cdot \text{E/S} \cdot \text{TH} \\ & (\pm 0,001) + 0,303 \cdot \text{T} \cdot \text{TH} (\pm 0,007) \end{aligned} \quad \textbf{(Equação 1)}$$

Onde: E/S é a relação enzima substrato, T é a temperatura e TH o tempo de hidrólise.

Além disso, os efeitos (Figura 2) foram avaliados pela diferença entre a soma das respostas obtidas no maior nível (+) e menor nível (-) de cada variável. Os dados estatísticos mostraram que todas as variáveis e suas interações afetaram significativamente a resposta (GH). Somente a temperatura, o tempo de hidrólise e a interação entre as mesmas tiveram efeitos positivos, ou seja, ao incrementar os níveis destas aumentaria a hidrólise da caseína.

Barros et al. (2010), avaliando os fatores que influenciam o grau de hidrólise da caseína caprina utilizando as proteases comerciais pepsina, papaína e tripsina, observaram que as melhores condições para a hidrólise da caseína caprina foram observadas com temperaturas entre 40 e 50 °C. Além disso, a relação E/S influenciou negativamente a variável resposta tanto para a papaína quanto para a tripsina, demonstrando que quanto menor for a concentração do substrato, maior será seu GH.

3.3. Análise dos hidrolisados de caseína em Tricina-SDS-PAGE

Os resultados observados para o GH foram corroborados com a análise dos hidrolisados por eletroforese Tricina-SDS-PAGE, havendo a presença de peptídeos menores que 4 kDa, como pode ser observado na Figura 3. As diferentes condições de hidrólise em que a caseína foi submetida com relação à proporção de E/S, tempo e temperatura de hidrólise influenciou diretamente na atuação das proteases frente ao substrato. Pode-se observar, neste caso, que as enzimas apresentaram melhores resultados de hidrólise quando submetidas a temperaturas mais elevadas e durante um maior tempo de hidrólise como é o caso da linha quatro referente às figuras 3A e 3B, respectivamente, em todas as proporções da relação E/S.

Arruda et al. (2012), trabalhando com proteases provenientes do látex da *Jacaratia corumbensis* obteve peptídeos com massas moleculares menores que 14kDa, havendo a presença de peptídeos com massas entre 1 e 2kDa após a análise de frações em espectrofotometria de massa. Demonstrando, a facilidade de hidrólise da caseína através de proteases de origem vegetal, sendo obtidos peptídeos na mesma faixa de massa molecular no presente trabalho (Figura 3).

Segundo Elzoghby et al. (2011), a facilidade de clivagem proteolítica da caseína ocorre pelo fato desta proteína apresentar uma estrutura aberta devido à alta concentração dos resíduos de prolina, as quais dificultam a formação de uma grande quantidade de estruturas secundárias e terciárias, uma vez que os resíduos de prolina interrompem a formação de α -hélice e folhas β , além de não haver pontes de dissulfeto na estrutura na caseína, tornando-as mais frágeis.

3.4. Cromatografia líquida de alta eficiência (RP-HPLC)

O ensaio 7 (1:50, 24h, 40 °C), que apresentou maior grau de hidrólise da caseína e conseqüentemente, maior formação de peptídeos com massas moleculares menores que 4kDa, foi utilizado nos processos de separação das frações peptídicas em RP-HPLC, sendo seus peptídeos coletados e testados quanto as atividades antimicrobiana e antioxidante. O perfil cromatográfico da amostra do ensaio 7 demonstrou a presença de uma série de peptídeos como apresentado na Figura 4. Um total de 15 frações foram coletadas em RP-HPLC, levando-se em consideração o nível de polaridade destas amostras, liofilizadas e armazenadas a -20 °C para posterior análise das atividades biológicas.

Segundo Brogden e Brogden (2011), peptídeos com atividade antimicrobiana, além de apresentarem diferentes tamanhos de cadeia peptídica e massas moleculares, também possuem características anfipáticas diferenciadas,

podendo ser mais ou menos polares. Neste sentido, Phelan et al. (2009), também relata que o grau de hidrofobicidade dos peptídeos é importante para que estas moléculas exerçam sua atividade antioxidante, tendo em vista que, ocorre um aumento da sensibilidade do peptídeo as moléculas hidrofóbicas ou aos radicais livres. Além disso, a quantidade de ligações peptídicas, os resíduos de aminoácidos e o nível de estruturação dos peptídeos influenciam diretamente sobre as atividades biológicas.

3.5. Atividade antimicrobiana das frações coletadas em RP-HPLC

Para a realização da atividade antimicrobiana, as amostras foram diluídas com água ultrapura para uma concentração 500µg/mL. Das 15 frações analisadas, nove (F1, F3, F5, F8, F9, F10, F11, F12, F13) apresentaram inibição de crescimento frente a todas as bactérias utilizadas (Tabela 4), mostrando o grande potencial de atividade biológica dos peptídeos obtidos a partir da hidrólise da caseína caprina.

Trabalhando com peptídeos obtidos a partir da fração κ-caseína, Cheng et al. (2013) observaram atividade antimicrobiana contra *E. coli* utilizando uma concentração de 500µg/mL. A natureza hidrofóbica dos peptídeos antimicrobianos representa um fator importante para que ocorram as interações hidrofóbicas com o núcleo da bicamada lipídica presente na membrana celular das bactérias, tendo como consequência seu rompimento, sendo assim, bactérias Gram-negativas são mais susceptíveis a ação dos peptídeos bioativos.

As demais frações (F2, F4, F6, F7, F14 e F15) foram menos eficientes na inibição do crescimento das bactérias Gram-positivas *Enterococcus faecalis* UFPEDA 138 e *Bacillus subtilis* UFPEDA 86. As frações 2, 7 e 14 inibiram apenas o crescimento das bactérias Gram-negativas. Isso se deve

provavelmente, ao fato das bactérias Gram-positivas possuírem uma parede celular mais espessa e composta apenas de proteoglicanas, dificultando assim a interação dos peptídeos com a membrana celular destas bactérias.

Silva et al. (2013) relataram que grande parte dos peptídeos com atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas, apresentam uma característica de se associar com cargas aniônicas das proteoglicanas presentes na parede celular, sendo portanto, denominados de peptídeos aniônicos. Segundo Yount e Yeaman (2013), as bactérias Gram-positivas apresentam várias camadas de proteoglicanas, intercaladas com ácido teicóico e lipoteicóico o que confere esta característica de carga negativa.

3.6. Atividade sequestradora de radicais: Método 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS)

Todas as frações de peptídeos provenientes do hidrolisado de caseína caprina analisado (ensaio 7), apresentaram capacidade de eliminação do radical livre ABTS^{•+}. Sendo destacadas as atividades das frações F6 e F12, as quais apresentaram maior percentual de atividade antioxidante (Tabela 5). Além disso, estas mesmas frações também corresponderam ao IC₅₀ em equivalente de atividade antioxidante analisado para as três substâncias com atividades antioxidantes já conhecidas, Trolox (500µM), ácido ascórbico (500µM) e ácido gálico (150µM).

Li et al. (2013), utilizando proteases comerciais para hidrólise de caseína caprina, observaram que os peptídeos apresentaram sensibilidade maior ao teste de ABTS, em comparação aos teste com DPPH, um outro radical livre utilizado para a avaliação da atividade antioxidante. Chang et al. (2013), trabalhando com proteases de *Bifidobacterium longum* KACC91563, observaram

que a atividade dos peptídeos hidrolisados da caseína apresentaram uma maior atividade antioxidante após 24 horas de hidrólise, obtendo como valores máximos de atividade de eliminação do radical ABTS^{•+}, de 2045,5µM equivalente de atividade antioxidante ao ácido gálico.

Esses autores relacionam a natureza dos peptídeos com a sensibilidade dos testes de atividade antioxidante, uma vez que, o ABTS apresenta-se solúvel tanto em meios orgânicos (álcool, etanol, metanol) quanto em meios inorgânicos (água), e o DPPH é solúvel apenas em solventes orgânicos. Sendo assim, os peptídeos que são solúveis em água, podem sofrer alterações em sua estrutura e perder a capacidade de atividade antioxidante. Portanto, neste estudo, as amostras foram analisadas apenas com o método de eliminação de radicais ABTS.

Trabalhando com proteases obtidas do látex de *Carica papaya*, Kittiphattanabawon et al. (2012) utilizando gelatina como substrato para obtenção dos peptídeos bioativos, obtiveram atividade máxima de eliminação do radical ABTS^{•+}, de 268,16µM equivalente de atividade antioxidante ao Trolox. Mostrando que, a diversidade de enzimas proteolíticas utilizadas junto com diferentes substratos proteicos, é capaz de gerar peptídeos com potencial maior ou menor de atividade antioxidante.

Segundo Samaranayaka e Li-Chan (2011), aminoácidos livres e peptídeos com cadeias aminoacídicas muito curtas geralmente não são considerados como moléculas com atividade antioxidante eficaz, levando-se a acreditar que uma proteólise muito elevada não é capaz de produzir moléculas com alta atividade. A atividade antioxidante mais elevada de peptídeos maiores envolve um conjunto de propriedades físicas e químicas conferidas pela sequência dos aminoácidos.

Muitos incluem resíduos de Val ou Leu na posição N-terminal, além da presença de peptídeos como Pro, His, Tyr, Trp, Met e Cys na sua sequência.

4. Conclusões

A temperatura e o tempo foram os principais fatores que influenciaram diretamente o grau de hidrólise das proteases presentes no látex da *Sideroxylon obtusifolium*. Estas enzimas foram eficientes tanto para a hidrólise da caseína caprina, quanto na geração de peptídeos com diferentes amplitudes de atividades antimicrobianas e antioxidantes. Entretanto, outros estudos se fazem necessários para verificar a estrutura tridimensional destes peptídeos e para possível emprego como suplementos para alimentos funcionais ou fármacos.

5. Agradecimentos

Os autores agradecem a Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio financeiro, e ao Centro Laboratorial de Apoio a Pesquisa da Unidade Acadêmica de Garanhuns, pela concessão do espaço físico para o desenvolvimento do trabalho.

6. Referências

ADLER-NISSEN, J. (1970). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27, 1256-1262.

ALENCAR, R. B., BIONDI, M. M., PAIVA, P. M. G., VIEIRA, V. L. A., CARVALHO JÚNIOR, L. B., & BEZERRA, R. S. (2003). Alkaline proteases from

the digestive tract of four tropical fishes. *Brazilian Journal of Food Technology*, 6, 279-284.

AO, J., & LI, B. (2013). Stability and antioxidative activities of casein peptide fractions during simulated gastrointestinal digestion *in vitro*: Charge properties of peptides affect digestive stability. *Food Research International*, 52, 334–341.

A. O. A. C. (1990). Official Method of Analysis 15th Edition. Association of Official Analytical Chemists Washington, D. U. S. A.

ARRUDA, M. S., SILVA, F. O., EGITO, A. S., LIMA-FILHO, J. L., PORTO, A. L. F., & MOREIRA, K. A. (2012). New peptides obtained by hydrolysis of caseins from bovine milk by protease extracted from the latex *Jacaratia corumbensis*. *LWT - Food Science and Technology*, 49, 73-79.

BARZYK, W., CAMPAGNA, S., WIECLAW, K., KORCHOWIEC, B., & ROGALSKA, E. (2009). The affinity of two antimicrobial peptides derived from bovine milk proteins for model lipid membranes. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 343, 104-110.

BRADFORD, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.

BROGDEN, K. N., & BROGDEN, K. A. (2011). Will new generations of modified antimicrobial peptides improve their potential as pharmaceuticals? *International Journal of Antimicrobial Agents*, 38, 217– 225.

CHANG, O. K., SEOL, K. H., JEONG, S. G., OH, M. H., PARK, B. Y., PERRIN, C., & HAM, J. S. (2013). Casein hydrolysis by *Bifidobacterium longum* KACC91563 and antioxidant activities of peptides derived therefrom. *Journal Dairy of Science*, 96, 1–12.

CHENG, X., TANG, X., WANG, Q., & MAO, X., Y. (2013). Antibacterial effect and hydrophobicity of yak k-casein hydrolysate and its fractions. *International Dairy Journal*, 31, 111-116.

EGITO, A. S., GIRARDET, J. M., LAGUNA, L. E., POIRSON, C., MOLLÉ, D., MICLO, L., HUMBERT, G., & GAILLARD, J. L. (2007). Milk – clotting activity of enzyme extracts from sunflower and albizia seeds and specific hydrolysis of bovine k- casein. *International Dairy Journal*, 17, 816-825.

EGITO, A. S., ROSINHA, G. M. S., LAGUNA, L. E., MICLO, L., GIRARDER, J. M., & GAILLARD, J. L. (2006). Fast electrophoretic detection method of adulteration of caprine milk by bovine milk. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 58, 932-939.

ELZOGHBY, A. O., EL-FOTOH, W. S. A., & ELGINDY, N. A. (2011). Casein-based formulations as promising controlled release drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 153, 206–216.

FERREIRA D. F. (2000). Análises estatísticas por meio do SISVAR para Windows versão 4.0. In: Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria, São Carlos: UFSCar, 255-258.

GHASSEM, M., ARIHARA, K., BABJI, A. S., SAID, M., & IBRAHIM S. (2012). Purification and identification of ACE inhibitory peptides from Haruan (*Channa striatus*) myofibrillar protein hydrolysate using HPLC–ESI-TOF MS/MS. *Food Chemistry*, 129, 1770–1777.

JIANG, Z., WANG, L., WU, W., & WANG, Y. (2013). Biological activities and physicochemical properties of Maillard reaction products in sugar–bovine casein peptide model systems. *Food Chemistry*, 141, 3837–3845.

KITTIPHATTANABAWON, P., BENJAKUL, S., VISESSANGUAN, W., & SHAHIDI, F. (2012). Gelatin hydrolysate from blacktip shark skin prepared using

papaya latex enzyme: Antioxidant activity and its potential in model systems.
Food Chemistry, 135, 1118–1126.

LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly
of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.

LI, Z., JIANG, A., YUE, T., WANG, J., WANG, Y., & SU, J. (2013). Purification
and identification of five novel antioxidant peptides from goat milk casein
hydrolysates. *Journal Dairy of Science*, 96, 4242–4251.

LIRA, T. B. F., BEZERRA, V. S., SILVA, F. O., DIAS, G. M. P., LIMA-FILHO, J.
L., PORTO, T. S. & PORTO, A. L. F. (2010). Avaliação de variáveis que
influenciam a hidrólise enzimática da caseína do leite de cabra Moxotó. *Pesquisa
Agropecuária Brasileira*, 45, 1036-1043.

MINE, Y., MA, F., & LAURIAU, S. (2004). Antimicrobial peptides released by
enzymatic hydrolysis of hen egg white lysozyme. *Journal of Agricultural and Food
Chemistry*, 52, 1088-1094.

PHELAN, M., AHERNE, A., FITZGERALD, R. J., & O'BRIEN, N. M. (2009).
Casein-derived bioactive peptides: Biological effects, industrial uses, safety
aspects and regulatory status. *International Dairy Journal*, 19, 643–654.

RAWDKUEN, S., PINTATHONG, P., CHAIWUT, P., & BENJAKUL, S. (2011).
The partitioning of protease from *Calotropis procera* latex by aqueous two-phase
systems and its hydrolytic pattern on muscle proteins. *Food and Bioproducts
Processing*, 89, 73–80.

RE, R., PELLEGRINI, N., PROTEGGENTE, A., PANNALA, A., YANG, M., &
RICE-EVANS, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical
cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26, 1231–1237.

SAMARANAYAKA, A. G. P., & LI-CHAN, E. C. Y. (2011). Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. *Journal of Functional Foods*, 3, 229–254.

SHIVAPRASAD, H. V., RAJAIAH, R. FREY, B. M., FREY, F. J., & VISHWANATH, B. S. (2010). 'Pergularain e I' – a plant cysteine protease with thrombin-like activity from *Pergularia extensa* latex. *Thrombosis Research*, 125, 100–105.

SILVA, A. C., NASCIMENTO, T. C. E. S., SILVA, S. A., HERCULANO, P. N., & MOREIRA, K. A. (2013). Potential of quixaba (*Sideroxylon obtusifolium*) latex as a milk-clotting agent. *Food Science and Technology*, 33, 494-499.

SILVA, N. C., SARMENTO, B., & PINTADO, M. (2013). The importance of antimicrobial peptides and their potential for therapeutic use in ophthalmology. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 41, 5–10.

SIRITAPETAWE, J., THUMANU, K., SOJIKUL, P., & THAMMASIRIRAK, S. (2012). A novel serine protease with human fibrinolytic activities from *Artocarpus heterophyllus* latex. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1824, 907–912.

YAZDI, S. R., & CORREDIG, M. (2012). Heating of milk alters the binding of curcumin to casein micelles. A fluorescence spectroscopy study. *Food Chemistry*, 132, 1143–1149.

YOUNT, N. Y., & YEAMAN, M. R. (2013). Peptide antimicrobials: cell wall as a bacterial target. *Annals of The New York Academy of Sciences*, 1277, 127–138.

FIGURAS

Figura 1. Análise do extrato bruto das proteínas do látex de *S. obtusifolium* realizada em gel de eletroforese de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (A). Zimografia em gel de gelatina das proteínas do látex de *S. obtusifolium* realizada em gel de eletroforese de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (B).

Figura 2. Gráfico de Pareto dos efeitos principais das variáveis relação enzima:substrato, temperatura e tempo na hidrólise da caseína caprina com proteases do látex da *Sideroxylon obtusifolium*, tendo como variável resposta o grau de hidrólise.

Figura 3. Gel de SDS-PAGE 15,4% da caseína caprina, hidrolisada em função do tempo e da temperatura, ao pH 6,5, por proteases do látex da *S. obtusifolium* nas proporções de 1:50(A); 1:150(B) e 1:100(C) relação Enzima/Substrato. PM (Padrão Molecular), CNc (Caseinato de Sódio Caprino), sendo 1 (8h-28°C), 2 (24h-28°C), 3 (8h-40°C) e 4 (24h-40°C), correspondentes as figuras 3A e 3B. A figura 3C representa os pontos centrais que apresentam as mesmas condições de hidrólise (16h-36°C).

Figura 4. Cromatografia líquida de alta eficiência (RP-HPLC) do hidrolisado (1:50, 40 °C, 24h), indicando as frações coletadas (F1 a F15).

TABELAS

Tabela 1. Matriz do planejamento fatorial 2^3 para investigar o grau de hidrólise das proteases presentes no látex da *Sideroxylon obtusifolium*.

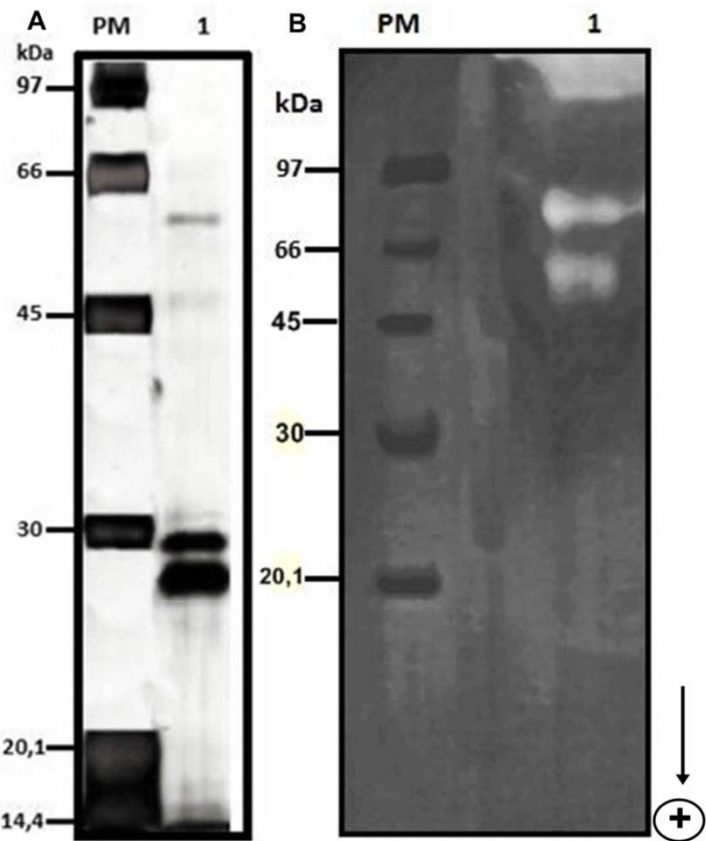
Tabela 2. Grau de Hidrólise da caseína caprina da raça Saanen.

Tabela 3. Análise de Variância para os dados obtidos no planejamento fatorial completo.

Tabela 4. Atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, das frações (F1-F15) coletadas através de cromatografia líquida (RP-HPLC). Concentração de 500 µg/mL. Os símbolos (+) e (-) indicam a presença ou ausência de inibição do crescimento microbiano, respectivamente.

Tabela 5. Atividade sequestradora do radical ABTS, das frações de peptídeos (F1-F15) hidrolisadas a partir de caseína caprina em (%). Atividade antioxidante equivalente ao Trolox (AAET), ao ácido ascórbico (AAEAA) e ao ácido gálico (AAEAG) em µM.

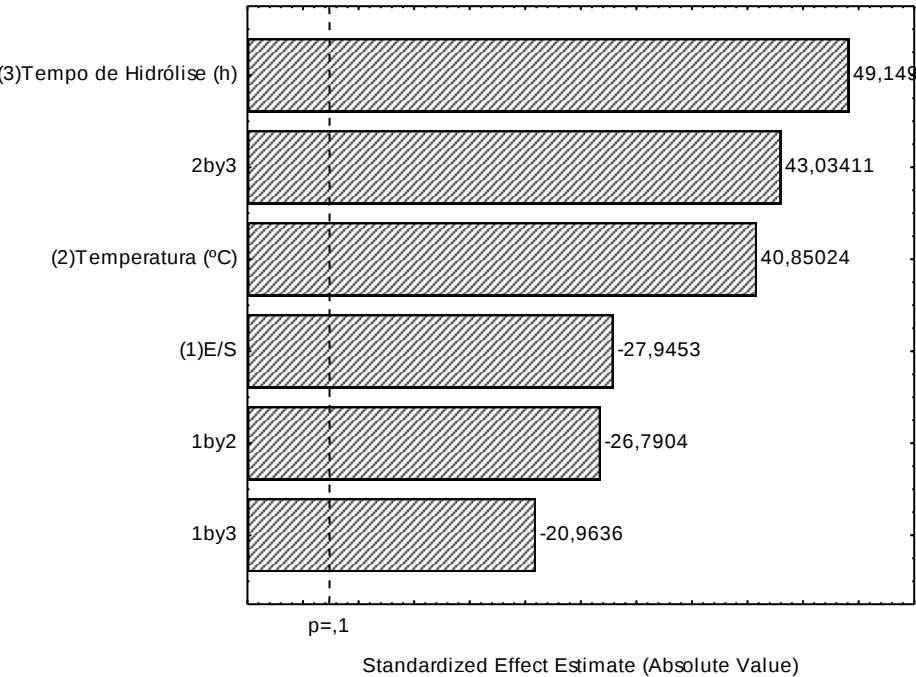
600 FIGURA 1.



601

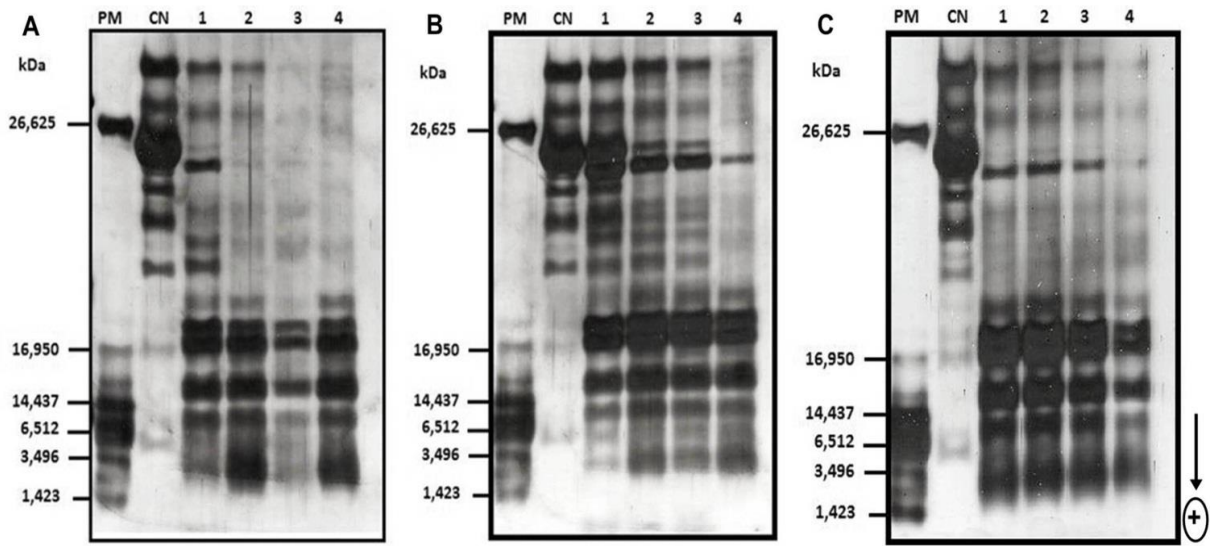
602

603 FIGURA 2.

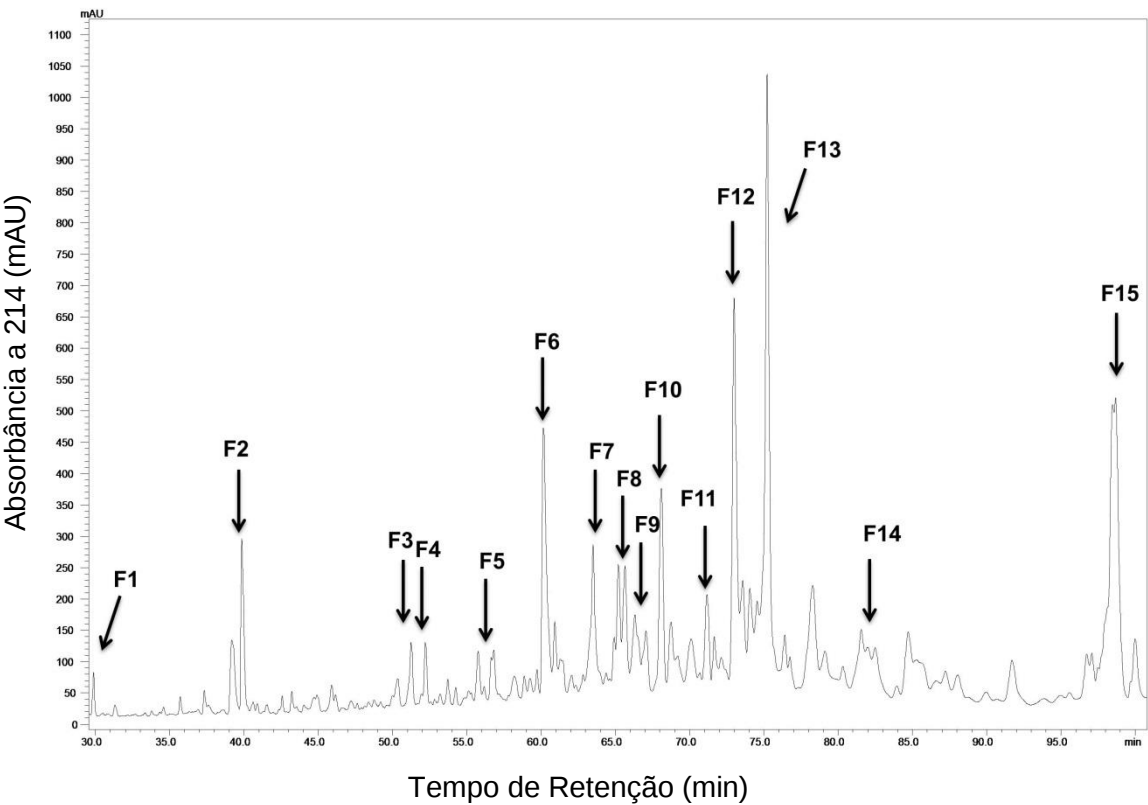


604

FIGURA 3.



608 FIGURA 4.



609

610

611

612 TABELA 1.

Fatores	Inferior (-1)	Central (0)	Superior (+1)
Temperatura (°C)	28	34	40
Tempo	8	16	24
Relação E/As	1:50	1:100	1:150

613 ^aE/S: Enzima/Substrato

614

615 TABELA 2.

Ensaio	Relação E/S	Temperatura (°C)	Tempo de Hidrólise (h)	Grau de Hidrólise (DH%)
1	1:50	28	8	4,486±0,12 ^f
2	1:150	28	8	4,734±0,55 ^f
3	1:50	28	24	7,716±0,26 ^e
4	1:150	28	24	8,835±0,75 ^{de}
5	1:50	40	8	8,833±0,17 ^{cde}
6	1:150	40	8	1,991±0,60 ^g
7	1:50	40	24	35,086±0,56 ^a
8	1:150	40	24	34,512±0,44 ^a
9	1:100	34	16	12,356±1,55 ^b
10	1:100	34	16	9,775±0,38 ^{cd}
11	1:100	34	16	9,124±0,91 ^{cde}
12	1:100	34	16	10,680±0,30 ^{bc}

616

617

618

619

620

621

TABELA 3.

Fonte de variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F-value	P-value
Regressão	4437,984	3	1479,328	3,075	0,090*
Resíduo	3849,170	8	481,146		
Total	8287,154				

TABELA 4.

Fração	Micro-organismos					
	<i>E. faecalis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>
F1	+	+	+	+	+	+
F2	-	-	-	+	+	+
F3	+	+	+	+	+	+
F4	-	+	-	+	+	+
F5	+	+	+	+	+	+
F6	+	-	-	+	+	+
F7	-	-	-	+	+	+
F8	+	+	+	+	+	+
F9	+	+	+	+	+	+
F10	+	+	+	+	+	+
F11	+	+	+	+	+	+
F12	+	+	+	+	+	+
F13	+	+	+	+	+	+
F14	-	-	-	+	+	+
F15	-	+	-	+	+	+

633 TABELA 5.

634

Atividade Sequestradora do Radical ABTS				
Fração	(%)	AAET (μM)	AAEAA (μM)	AAEAG (μM)
F1	8,593±0,21	76,869±2,11	71,600±2,11	12,983±0,65
F2	21,735±1,11	210,43±11,32	205,432±11,34	54,092±3,48
F3	17,523±0,30	167,622±3,06	162,537±3,06	40,916±0,94
F4	13,901±0,55	130,807±5,55	125,648±5,56	29,585±1,71
F5	18,281±0,77	175,327±7,81	170,258±7,83	43,288±2,40
F6	50,884±0,42	506,660±4,27	502,267±4,28	145,268±1,31
F7	18,113±0,53	173,615±5,40	168,543±5,41	42,761±1,66
F8	15,164±0,29	143,649±2,97	138,516±2,98	33,538±0,91
F9	15,670±0,53	148,786±5,41	143,663±5,42	35,119±1,67
F10	22,157±0,44	214,710±4,44	209,722±4,45	55,409±1,37
F11	26,116±0,38	254,950±3,89	250,043±3,90	67,795±1,20
F12	51,980±0,17	517,790±1,74	513,419±1,75	148,694±0,54
F13	19,798±0,19	190,738±1,93	185,701±1,93	48,031±0,59
F14	13,563±0,41	127,382±4,12	122,216±4,13	28,531±1,27
F15	17,692±0,41	169,334±4,20	164,253±4,21	41,443±1,29

635

636

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As proteases presentes no látex da quixabeira (*Sideroxylon obtusifolium*) apresentam grande potencial biotecnológico para hidrólise da caseína caprina e consequente liberação de peptídeos com diferentes tipos de atividades biológicas, como a atividade antimicrobiana e antioxidante, apresentadas neste trabalho. Diante do exposto torna-se de fundamental importância o conhecimento aprofundado da estrutura e mecanismos de catálise destas proteases para futuras aplicações industriais.