

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

Natália Boia Soares

**OBTENÇÃO DE HIDROLISADO PROTEICO DE TORTA DE SOJA E
AVALIAÇÃO DE SUA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**

Rio de Janeiro

2013

Natália Boia Soares

**OBTENÇÃO DE HIDROLISADO PROTEICO DE TORTA DE SOJA E
AVALIAÇÃO DE SUA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**

Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição – da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição

Orientadora Professora Doutora Maria Gabriela Bello Koblitz
Co-orientadora Pesquisadora Doutora Ana Lúcia Penteado

Rio de Janeiro
2013

S676 Soares, Natália Boia.
Obtenção de hidrolisado proteico de torta de soja e avaliação de sua atividade antimicrobiana / Natália Boia Soares, 2013.
88 f. ; 30 cm

Orientadora: Maria Gabriela Bello Koblitz.

Coorientadora: Ana Lúcia Penteado.

Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

1. Agentes antiinfeciosos. 2. Peptídeo hidrolases. 3. Bactérias Gram-Positivas. I. Koblitz, Maria Gabriela Bello. II. Penteado, Ana Lúcia. III. Universidade Federal do Estado do Rio Janeiro. Centro de Ciências Biológicas e de Saúde. Curso de Mestrado em Alimentos e Nutrição. IV. Título.

CDD – 615.329

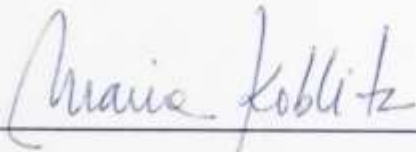
Natália Boia Soares

**OBTENÇÃO DE HIDROLISADO PROTEICO DE TORTA DE SOJA E
AVALIAÇÃO DE SUA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**

Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição – da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição

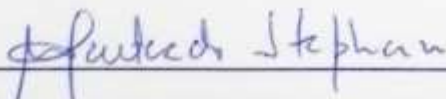
Aprovado em 30 / 09 / 13

BANCA EXAMINADORA



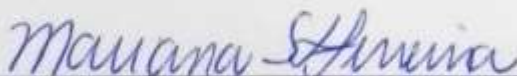
Dra Maria Gabriela Bello Koblitz

Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO



Dra Marília Penteado Stephan

Embrapa Agroindústria de Alimentos – Embrapa



Dra Mariana Simões Larraz Ferreira

Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO

Dedico este trabalho àquela que mesmo ausente,
se faz presente e me impulsiona a seguir adiante.
Querida mamãe Maria Lúcia, a quem amarei eternamente.

AGRADECIMENTOS

À Deus por me carregar em Teus braços nos momentos em que minhas forças humanas haviam se esgotado.

Ao meu amado pai José Acácio pela dedicação e por ter transmitido a mim sabedoria, amor e princípios fundamentais para que eu possa discernir o que é primordial na vida.

À minha amada irmã e amiga Ana, por estar ao meu lado em todos os momentos da minha vida com tanta paciência. Por tantas vezes ser meu exemplo, meu equilíbrio, meu pilar.

À minha querida tia Cecília, por todo carinho e incentivo na minha vida pessoal, acadêmica e profissional.

À minha querida avó Dulce pelo amor, orgulho e apoio em todas as minhas escolhas.

Ao Marcos por ser tão especial pra mim, com toda paciência, compreensão e carinho.

Aos meus amados amigos por compreenderem minha ausência, necessária em tantos momentos nesta jornada.

À minha querida orientadora Gabriela por toda paciência, dedicação, compreensão e carinho que teve comigo ao longo do desenvolvimento deste trabalho e por ser um exemplo de profissional a ser seguido.

À minha co-orientadora Ana Lúcia por ter aberto as portas do laboratório onde é responsável, com tanto carinho e disponibilidade para realizar minhas análises, e pelo apoio em todo momento.

Aos professores e à coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição por toda dedicação e incentivo nestes dois anos, e por me ajudarem a amadurecer profissionalmente neste processo.

Aos meus colegas, companheiros e amigos do corpo discente que tornaram esta jornada muito mais leve com momentos de descontração e troca constante de experiências.

À equipe do laboratório de Microbiologia da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Ana Paula, Simone, Vanessa, Ivan e ao pesquisador Doutor Eduardo, por todo auxílio e por permitirem que meu trabalho caminhasse de maneira tranquila e extremamente satisfatória.

Às pesquisadoras Dra. Marília e Dra. Caroline, à Tatiana e ao Alessandro do laboratório de Bioquímica da Embrapa por toda ajuda durante a minha pesquisa.

À todos os profissionais da Embrapa e da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro que de alguma maneira colaboraram para o desenvolvimento do meu trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior por fomentar o desenvolvimento do presente trabalho através da Bolsa de Demanda Social.

Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos.

Isaac Newton

RESUMO

A contaminação de alimentos é um problema sério uma vez que causa grandes índices de morbidade. A resistência progressiva desenvolvida pelos microrganismos patogênicos aos conservantes químicos e os possíveis danos à saúde causados por sua utilização geram a necessidade de descobrir-se novas substâncias antimicrobianas. Dentre as possibilidades atualmente estudadas encontram-se a utilização de bacteriocinas, componentes orgânicos das plantas e peptídeos com atividade antimicrobiana. A soja é uma importante fonte de proteínas, além de conter compostos com potencial atividade antimicrobiana, como as saponinas e a fitoalexina gliceolina. Tendo em vista estes aspectos, com o presente trabalho objetivou-se desenvolver procedimento metodológico para extrair e hidrolisar proteínas da torta de soja, resíduo da extração do óleo e, a partir disto, testar os diferentes hidrolisados obtidos contra diferentes microrganismos patogênicos. Para tanto foi utilizada a seguinte metodologia geral: extração e isolamento de proteínas solúveis da torta de soja; obtenção de hidrolisados proteicos e avaliação do rendimento da reação, a partir de duas enzimas proteolíticas comerciais: papaína e pepsina; avaliação da massa molecular das proteínas e peptídeos; e a avaliação da atividade antimicrobiana dos hidrolisados contra *Salmonella* Enteritidis, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella* Brasil e *Escherichia coli*. As proteínas hidrossolúveis da torta de soja foram extraídas de forma aperfeiçoada sob as seguintes condições: 5 g de torta para 100 mL de solução tampão pH 9,0, rendendo 11,33 g/100 g de torta de soja. Os hidrolisados proteicos da torta de soja com os resultados mais significantes foram obtidos utilizando o pH ótimo de atividade das enzimas proteolíticas no meio reacional, a proporção de 1mg de enzima para 66,66 mg de proteínas, em temperatura de 50°C e por um tempo de reação de 1h. A observação dos géis de eletroforese indicou que a hidrólise pode ter sido total ou houve formação de peptídeos menores do que 1kDa, não sendo detectados pelo método. Os hidrolisados apresentaram atividade antimicrobiana contra todos os microrganismos testados, sendo as bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus*) mais susceptíveis. A partir de um valor médio de 3,753 mg/mL (CIM), o hidrolisado proteico da torta de soja obtido em pH 7,0, com uso da papaína, foi capaz de inibir o crescimento de *S. aureus*. Deste modo, a utilização de hidrolisados da torta de soja com potencial antimicrobiano apresenta-se como uma alternativa a ser explorada pela indústria para o controle de patógenos em alimentos.

Palavras-chave: Proteases. Peptídeos antimicrobianos. Bactérias Gram-positivas.

ABSTRACT

Food contamination is a serious problem since it causes major morbidity. The progressive resistance developed by pathogens to chemical preservatives and the possible damage to health caused by their use generates the need to discover new antimicrobial substances. Among the possibilities currently studied are found the use of bacteriocins, organic components of plants and peptides with antimicrobial activity. Soybean is an important source of protein and contains compounds with potential antimicrobial activity, such as saponins and the phytoalexin glyceollin. Considering these aspects, the present work was aimed to develop methodological procedure to extract and hydrolyze proteins of soybean cake, a residue from the extraction of oil, and from this point test the different hydrolysates against different pathogenic microorganisms. For this purpose the following general methodology was used: extraction and isolation of soluble proteins from soybean cake; obtainment of protein hydrolysates and evaluation of the degree of hydrolysis, from two commercial proteolytic enzymes: papain and pepsin; evaluation of the molecular mass of proteins and peptides; and antimicrobial activity of hydrolysates against *Salmonella* Enteritidis, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella* Brasil and *Escherichia coli*. The soluble proteins from soybean cake were extracted optimally under the following conditions: 5 g of soybean cake to 100mL of buffer at pH 9.0, yielding 11.33g per 100g of soybean cake. Protein hydrolysates from soybean cake with the most significant results were obtained using the optimum pH value for proteolytic enzymes activity in the reaction medium, the proportion of 1mg of enzyme to 66.66 mg of protein, in a temperature of 50 ° C and for a time reaction of 1h. The observations of the electrophoresis gels indicated that the hydrolysis might have been complete or peptides smaller than 1 kDa were formed, not being detected by this method. Hydrolysates showed antimicrobial activity against all tested microorganisms, and the Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus*) were more susceptible. From a mean value of 3.753 mg / ml (MIC), the protein hydrolyzate from soybean cake obtained at pH 7.0 applying papain was able to inhibit the growth of *S. aureus*. Thus, the use of the hydrolyzate from soybean cake with antimicrobial activity is presented as an alternative to be explored by the industry for the control of pathogens in food.

Key-words: Protease. Antimicrobial peptides. Gram-positive bacteria.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Estruturas químicas de fitoalexinas soja: gliceolinas I, II e III (Nwachukwu, 2013).	34
Figura 2 Superfície de resposta da otimização da extração de proteínas da torta de soja (Software Statistica 7.0)	50
Figura 3 Atividade antimicrobiana de hidrolisados contra <i>L. monocytogenes</i>	52
Figura 4 Atividade antimicrobiana de hidrolisados contra <i>S. Enteritidis</i>	52
Figura 5 Diagrama de Pareto para análise das variáveis utilizadas no processo de hidrólise, pela atividade antimicrobiana contra <i>S. Enteritidis</i>	53
Figura 6 Diagrama de Pareto para análise das variáveis utilizadas no processo de hidrólise, pela atividade antimicrobiana contra <i>L. monocytogenes</i>	53
Figura 7 Comparação estatística do Rendimento da Reação de Hidrólise Enzimática do Extrato proteico da torta de soja. Letras diferentes representam resultados significativamente diferentes ($p < 0,05$)	54
Figura 8 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) das amostras tratadas com pepsina (2.1, 2.2) e papaína (A1, A2 e A3).....	55
Figura 9 Eletroforese em gel SDS-PAGE Tris-Tricina (16,5%T, 3%C) com amostras tratadas com pepsina (2.1, 2.2) e papaína (A1, A2 e A3).....	56
Figura 10 Halos de inibição: bactérias Gram-positivas pelo Método de difusão em poços de ágar (PAPAÍNA)	59
Figura 11 Halos de inibição: bactérias Gram-negativas pelo Método de difusão em poços de ágar (PAPAÍNA)	60
Figura 12 Comparação estatística de atividade antimicrobiana contra Bactérias Gram- positivas, entre Hidrolisado e Branco em pH 7,0 (PAPAÍNA).....	61
Figura 13 Comparação estatística de atividade antimicrobiana contra Bactérias Gram- negativas, entre Hidrolisado e Branco em pH 7,0 (PAPAÍNA)	61

Figura 14 Halos de inibição: bactérias Gram-positivas pelo Método de difusão em poços de ágar (PEPSINA)	64
Figura 15 Halos de inibição: bactérias Gram-negativa pelo Método de difusão em poços de ágar (PEPSINA)	65
Figura 16 Comparação estatística de atividade antimicrobiana contra Bactérias Gram-positivas, entre Hidrolisado e Branco em pH 2,0 (PEPSINA)	66
Figura 17 Comparação estatística de atividade antimicrobiana contra Bactérias Gram-negativas, entre Hidrolisado e Branco em pH 2,0 (PEPSINA)	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Aditivos químicos com efeito de conservadores permitidos para uso em alimentos em geral (adaptado de CODEX, 2013).....	23
Tabela 2 Principais Óleos Vegetais: Fornecimento e Distribuição Mundial.....	31
Tabela 3 Planejamento experimental (rotacional central) para otimização da extração de proteínas da torta de soja	40
Tabela 4 Planejamento fatorial completo 2 ⁿ para o teste exploratório de obtenção dos hidrolisados.....	41
Tabela 5 Composição do tampão de amostra para SDS-PAGE	43
Tabela 6 Composição do Tampão de Amostras para SDS-Tricina-PAGE	45
Tabela 7 Esquema de Preparação de Diluições de Agentes Antimicrobianos a Serem Usados em Testes de Sensibilidade por Diluição em Caldo	47
Tabela 8 ANOVA: Otimização da Extração de Proteínas da Torta de Soja (Software Statistica 7.0)	50
Tabela 9 Concentração inibitória mínima de Hidrolisado em pH 7,0 por papaína contra <i>S. aureus</i>	62

LISTA DE SIGLAS

Aa	Atividade de Água
ATCC	American Type Culture Collection
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DTAs	Doenças Transmitidas por Alimentos
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EUA	Estados Unidos da América
FDA	Food and Drug Administration
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
MM	Massa molecular
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PAMs	Peptídeos Antimicrobianos
RH	Rendimento da Hidrólise
SDS	Dodecilsulfato de Sódio
SPI	Soy Protein Isolate
SPC	Soy Protein Concentrate
TRICINA	N-Tris(Hidroximetil)metilglicina
TRIS	Tris(Hidroximetil)aminometano
TSA	Trypticase Soy Agar
TSAYE	Trypticase Soy Agar with Yeast Extract

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS E SEUS AGENTES	18
2.1.1 Microrganismos.....	19
2.2 ATIVIDADE DE AGENTES ANTIMICROBIANOS EM ALIMENTOS E SUA UTILIZAÇÃO	21
2.2.1 Conservadores químicos	22
2.2.2 Peptídeos Bioativos	24
2.2.2.1 Peptídeos antimicrobianos e Bacteriocinas	24
2.3 OBTENÇÃO DE HIDROLISADOS PROTEICOS ATRAVÉS DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS	27
2.4 SOJA: CARACTERÍSTICAS E UTILIZAÇÃO.....	28
2.4.1 Torta de soja: características, obtenção e utilização	30
2.5 COMPOSTOS ORGÂNICOS ANTIMICROBIANOS EM VEGETAIS	32
2.5.1 Fitoalexinas	32
2.5.2 Fitoanticipinas	34
2.6 UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS INDUSTRIAIS	35
3 OBJETIVO GERAL	37
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
4 MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1 MATERIAL.....	38
4.1.1 Material Vegetal.....	38
4.1.2 Microrganismos.....	38
4.1.3 Reagentes e meios de cultura	39
4.1.4 Enzimas	39
4.2 METODOLOGIA	39

4.2.1	Otimização da extração de proteínas hidrossolúveis da torta de soja	39
4.2.2	Isolamento de proteínas solúveis da torta de soja	40
4.2.3	Teste preliminar de obtenção dos hidrolisados	41
4.2.4	Obtenção dos hidrolisados	42
4.2.5	Avaliação do rendimento da reação	42
4.2.6	Avaliação da massa molecular das proteínas utilizadas e dos peptídeos obtidos ...	43
4.2.7	Avaliação da atividade antimicrobiana dos hidrolisados contra <i>Salmonella</i> Enteritidis, <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Salmonella Brasil</i> e <i>Escherichia coli</i>	45
4.2.8	Análise estatística.....	48
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1	OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO DAS PROTEÍNAS HIDROSSOLÚVEIS DA TORTA DE SOJA	49
5.2	TESTE PRELIMINAR DE OBTENÇÃO DOS HIDROLISADOS	51
5.3	AVALIAÇÃO DO RENDIMENTO DA REAÇÃO DE HIDRÓLISE.....	54
5.4	AVALIAÇÃO DA MASSA MOLECULAR DE PROTEÍNAS E PEPTÍDEOS OBTIDOS	55
5.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	57
5.5.1	Resultados da Atividade Antimicrobiana de Hidrolisados obtidos com uso de Papaína	58
5.5.2	Resultados da Atividade Antimicrobiana de Hidrolisados obtidos com uso de Pepsina	63
6	CONCLUSÃO.....	69
7	PERSPECTIVAS.....	70
	REFERÊNCIAS	71
	APÊNDICE A – RESULTADOS DA OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO DAS PROTEÍNAS HIDROSSOLÚVEIS DA TORTA DE SOJA.....	80
	APÊNDICE B – RESULTADOS DO TESTE PRELIMINAR DE OBTENÇÃO DOS HIDROLISADOS.....	81

APÊNDICE C – RESULTADOS DO RENDIMENTO DE HIDRÓLISE REALIZADA COM PAPAÍNA.....	82
APÊNDICE D – RESULTADOS DO RENDIMENTO DE HIDRÓLISE REALIZADA COM PEPSINA.....	83
APÊNDICE E – ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS DO RENDIMENTO DE HIDRÓLISES REALIZADAS COM PAPAÍNA E PEPSINA.....	84
APÊNDICE F – HALOS DE INIBIÇÃO (mm) DAS REPETIÇÕES PARA <i>S. aureus</i> , <i>L. monocytogenes</i> e <i>B. cereus</i> (papaína).....	85
APÊNDICE G – HALOS DE INIBIÇÃO (mm) DAS REPETIÇÕES PARA <i>S. Enteritidis</i> , <i>S. Brasil</i> e <i>E. coli</i> (papaína).....	86
APÊNDICE H – HALOS DE INIBIÇÃO (mm) DAS REPETIÇÕES PARA <i>S. aureus</i> , <i>L. monocytogenes</i> e <i>B. cereus</i> (pepsina).....	87
APÊNDICE I – HALOS DE INIBIÇÃO (mm) DAS REPETIÇÕES PARA <i>S. Enteritidis</i> , <i>S. Brasil</i> e <i>E. coli</i> (pepsina).....	88

1 INTRODUÇÃO

A transmissão de patógenos através da produção e comercialização de alimentos é um problema sério, uma vez que causa grandes índices de morbidade e ainda nos dias atuais, é um problema não solucionado (GÁLVEZ, 2010; SHAH, 2000). Dentre os principais microrganismos causadores de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) encontram-se: *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* (GÁLVEZ, 2010; MELO de, 2005; MILLS, 2011; U.S.F.D.A., 2013). A incidência de infecções bacterianas em seres humanos tornou-se uma grande preocupação em ambos os setores, de alimentos e médico, em todo o mundo, gerando a necessidade de novos agentes terapêuticos. É necessário que sejam desenvolvidas alternativas de conservação para que, aliadas às tecnologias existentes, seja possível disponibilizar alimentos mais seguros sob o ponto de vista microbiológico. O grande desafio da indústria de alimentos é adotar medidas no processamento de seus produtos que possibilitem o controle do crescimento microbiano, alterando minimamente as características sensoriais e nutricionais dos alimentos (GÁLVEZ, 2010; ORDÓÑEZ, 2005).

Embora conservantes químicos possam ser uma solução, a descoberta de novas substâncias antimicrobianas faz-se necessária devido ao desenvolvimento progressivo de resistência por microrganismos patogênicos a estas substâncias (KIM, 2010; MILLS, 2011). Nos últimos anos, diversas pesquisas evidenciam que peptídeos bioativos e proteínas derivadas de alimentos podem ter efeitos benéficos sobre a saúde humana (BIZIULEVIČIUS, 2006; GOBBETTI, 2004; MILLS, 2011). Diferentes atividades fisiológicas e metabólicas vêm sendo descritas após ensaios *in vivo* e *in vitro* com proteínas e peptídeos bioativos. Dentre os mais estudados encontra-se o efeito antimicrobiano (AGYEI, 2011; LÓPEZ-EXPÓSITO, 2007).

Peptídeos antimicrobianos (PAMs) podem ser gerados a partir de hidrólise enzimática (KIM, 2010; KORHONEN, 2006). Tratando-se de alimentos funcionais, a utilização de hidrolisados proteicos não-purificados (onde há a mistura de vários peptídeos) ao invés de um único peptídeo purificado, demonstra melhores atividades biológicas, quando aplicados em alimentos (SARMADI, 2010; WU, 2002). Atualmente já foram identificados PAMs a partir de hidrolisados de inúmeras proteínas de origem alimentar, especialmente derivadas do leite, porém proteínas contendo essa atividade biológica são também encontradas nos ovos, na carne e em peixes, bem como em diferentes fontes vegetais de proteínas, como soja, trigo,

entre outras (AGYEI, 2011; GOBBETTI, 2004). As condições operacionais empregadas no processamento de isolados proteicos, o tipo de protease e o grau de hidrólise afetam diretamente as atividades antioxidantes e biológicas (MOURE; DOMINGUEZ; PARAJO, 2006). A fonte inicial de proteína, a estratégia de produção utilizada e as condições de processamento, são os fatores que influem na obtenção de peptídeos com atividades biológicas distintas (KIM; PARK; RHEE, 1990).

A soja é uma importante fonte de proteínas e uma potencial fonte de peptídeos bioativos (MEJIA de; LUMEN de, 2006). Além disso, a soja apresenta uma variedade de compostos com potencial atividade antimicrobiana, como as saponinas e a fitoalexina gliceolina (BURDEN, 1975; KOBLITZ, 2011; NASCIMENTO, 2003). A torta de soja, um subproduto obtido durante o processamento de óleo de soja, apresenta-se como uma fonte de isoflavonas além de seu elevado teor de proteínas. No entanto, a variedade de outros componentes funcionais presentes na torta de soja permanece desconhecida (KAO; CHEN, 2006). Atualmente, há um crescente interesse na biotransformação de resíduos, tendo em vista serem materiais de baixo custo e altamente renováveis. Deste modo, a utilização de resíduos, além de diminuir o impacto sobre o meio ambiente, pode ser um fator importante para a produção de subprodutos e diminuição nos custos de produção industrial (PANDEY; SOCCOL; MITCHEL, 2000).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS E SEUS AGENTES

Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) são todas as ocorrências clínicas consequentes à ingestão de alimentos que possam estar contaminados com microrganismos patogênicos (infecciosos, toxigenicos ou infestantes), substâncias químicas, objetos lesivos ou que contenham em sua constituição estruturas naturalmente tóxicas, ou seja, são doenças consequentes à ingestão de perigos biológicos, químicos ou físicos presentes nos alimentos (SILVA JR, 2008).

A transmissão de patógenos de origem alimentar através da produção e comercialização de alimentos, ainda nos dias atuais, é um problema não solucionado (GÁLVEZ et al, 2010). A contaminação de alimentos é um grave problema, uma vez que causa grandes índices de morbidade (SCHULZ et al, 2009). A globalização do mercado de alimentos e as novas tendências na produção e distribuição destes, juntamente com mudanças nos hábitos de consumo e susceptibilidade da população (como os idosos ou pessoas imunocomprometidas) são sempre apontadas como os principais fatores que contribuem para a propagação destes patógenos (GÁLVEZ et al, 2010).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que, a cada ano, mais de dois milhões de pessoas morram por doenças diarreicas, muitas das quais adquiriram ao ingerir alimentos contaminados. Estima-se que as DTAs causem, anualmente, nos Estados Unidos (EUA), aproximadamente 76 milhões de casos, 325.000 hospitalizações e 5 mil mortes (MELO de; SOARES; GONÇALVES, 2005). No Brasil, faz-se a vigilância epidemiológica de surtos de DTAs e não de casos individuais, com exceção da cólera, febre tifóide e botulismo. Essa vigilância teve início em 1999 e há registro médio de 665 surtos por ano, com 13 mil doentes (BRASIL, 2012). Estimativas de DTAs podem ser usadas para políticas de segurança alimentar e intervenções. No entanto, chegar a essas estimativas é um grande desafio, porque os alimentos podem ser contaminados por muitos agentes e apenas uma pequena proporção das DTAs é confirmada por testes de laboratório e informada aos órgãos de saúde pública (SCALLAN et al, 2011).

2.1.1 Microrganismos

Segundo dados do órgão governamental dos EUA Food and Drug Administration (FDA), são listados (em ordem alfabética) como os principais microrganismos causadores de DTAs: *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Cryptosporidium*, *Cyclospora cayetanensis*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Norovirus*, *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* (U.S.F.D.A., 2013). No Brasil, o Ministério da Saúde informa que as DTAs em sua maioria, são causadas por *Salmonella*, *Escherichia coli* patogênica e *Clostridium perfringens*, e pelas toxinas de *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* (BRASIL, 2013c). Em diversos estudos muitas das DTAs estão associadas à *Listeria monocytogenes*, *Salmonella sp.*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* e *Toxoplasma gondii* (GÁLVEZ, 2010; MELO de, 2005; MILLS, 2011).

Entre as bactérias Gram-positivas, *Listeria monocytogenes* é o agente patogênico considerado de maior preocupação, devido à sua capacidade para sobreviver e crescer em uma ampla variedade de substratos de alimentos e condições ambientais, incluindo a refrigeração (GÁLVEZ et al, 2010). *L. monocytogenes* é um bacilo, não formadora de esporos, anaeróbia facultativa. É catalase positiva e oxidase negativa. Seu meio ideal de crescimento é o TSAYE (Trypticase Soy Agar with Yeast Extract), e sua temperatura ótima de crescimento gira em torno de 30°C (FARBER; PETERKIN, 1991).

Staphylococcus aureus é uma espécie de estafilococo Gram-positivo, anaeróbia facultativa, catalase e coagulase positivas. As células são esféricas (cocos) únicas ou combinadas. A parede celular é resistente à lisozima. Algumas cepas de *S. aureus* são capazes de produzir enterotoxinas estafilocócicas, que são os agentes causadores de intoxicações alimentares. A contaminação por *S. aureus* pode ser prontamente evitada por tratamento térmico dos alimentos. No entanto, continua a ser uma das principais causas de DTAs, pois pode contaminar produtos alimentares durante a preparação e processamento. É capaz de crescer numa grande faixa de temperatura (7 ° a 48,5 ° C, com a temperatura ótima de crescimento entre 30 e 37 ° C), de pH (4,2 a 9,3, com um ótimo entre 7,0 e 7,5) e suporta altas concentrações de cloreto de sódio (até 15% de NaCl). Estas características permitem que este microrganismo cresça numa grande variedade de alimentos (LOIR; BARON; GAUTIER, 2003).

Bacillus cereus é uma bactéria Gram-positiva, facultativamente aeróbia, formadora de esporos e possui formato cilíndrico. Dois tipos de doenças são causados por metabólitos distintos. O tipo diarreico é causado por uma proteína de elevada massa molecular, termolábil. Este tipo de intoxicação gera os seguintes sintomas: diarreia, cólicas abdominais e dor (6 a 15 h após o consumo de alimentos contaminados, com duração de 24 h). O tipo emético é causado por um peptídeo de baixa massa molecular, estável ao calor. Este tipo provoca náuseas e vômitos (dentro de 30 minutos a 6 h após o consumo de alimentos contaminados, durante menos de 24 h) e, ocasionalmente, cólicas abdominais e/ou diarreia (LOIR; BARON; GAUTIER, 2003).

Escherichia coli é uma parte da família *Enterobacteriaceae*. É morfologicamente classificada como uma bactéria não formadora de esporos, Gram-negativa. É mesófila, anaeróbia facultativa, sendo uma habitante normal do intestino de humanos e outros animais (mamíferos e aves). *E. coli* é um microrganismo indicador e a sua presença nos alimentos ou na água é geralmente indicativo de contaminação fecal. Com base nos fatores de virulência, manifestações clínicas e epidemiologia, as linhagens de *E. coli* consideradas patogênicas são, atualmente, agrupadas em cinco classes: 1) EPEC (*E. coli* enteropatogênica clássica); 2) EIEC (*E. coli* enteroinvasora); 3) ETEC (*E. coli* enterotoxigênica); 4) EHEC (*E. coli* enterohemorrágica); 5) EAaggEC (*E. coli* enteroagregativa) (FRANCO, B. 2008; WHITE, 2011).

Salmonella é um gênero da família *Enterobacteriaceae*. São morfologicamente classificadas como Gram-negativas não formadoras de esporos. O habitat normal destas mesófilas anaeróbias facultativas é o trato gastrointestinal dos animais, pássaros, insetos e alguns répteis (tartarugas e rãs). O gênero *Salmonella* é dividido em duas espécies, *Salmonella enterica* e *S. bongori*. Dentro da espécie entérica existem mais de 2.500 sorotipos e todos são considerados patógenos para humanos. O crescimento de *Salmonella* ocorre entre 5 e 46 °C, sendo a sua temperatura ótima de crescimento compreendida entre 35 e 37 °C. *Salmonella* são geralmente sensíveis ao calor e elevada acidez (pH 4,5 ou menos) (WHITE, 2011).

Salmonella enterica sorotipo Enteritidis principal responsável por surtos alimentares envolvendo contaminação de ovos, é de grande importância na área de alimentos, pois é sabido que ela pode infectar os ovários de galinhas poedeiras e o ovo antes da casca ser produzida (WHITE, 2011).

Salmonella Brasil foi isolada de polpa de açaí não pasteurizada, e identificada na Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Esta cepa faz parte da coleção de microrganismos do laboratório de microbiologia da Embrapa Agroindústria de Alimentos (informação verbal) ¹

As doenças infecciosas estão entre as principais causas de morte da população humana. Esse fato é causado, em grande parte, pelo surgimento de microrganismos multi-resistentes aos antibióticos, principalmente devido ao uso indiscriminado de antibióticos pela população, e pela grande quantidade de agentes antimicrobianos utilizada na indústria agropecuária para promover o controle microbiano. Torna-se necessário, então, o desenvolvimento de novas alternativas de conservação, para garantir a disponibilidade de alimentos mais seguros, sob o ponto de vista microbiológico (GÁLVEZ, 2010; NASCIMENTO, 2003).

2.2 ATIVIDADE DE AGENTES ANTIMICROBIANOS EM ALIMENTOS E SUA UTILIZAÇÃO

A principal forma de deterioração dos alimentos é de origem microbiológica, principalmente por contaminantes contidos na sua superfície. A presença de microrganismos nos alimentos pode, além de reduzir a vida de prateleira, causar intoxicações ou infecções (dependendo do microrganismo contaminante) no consumidor (MELO de; SOARES; GONÇALVES, 2005).

A indústria de alimentos utiliza diversas medidas durante seu processo produtivo que viabilizam o controle do crescimento microbiano, encontrando-se entre as mais comuns, aquelas que promovam a modificação das condições ambientais, podendo ser mencionadas: o decréscimo da atividade de água (Aa) mediante a desidratação do alimento ou a adição de solutos; a diminuição da temperatura ao nível de refrigeração ou do congelamento; o decréscimo do pH; a adição de substâncias químicas (conservador); a modificação da atmosfera (ORDÓÑEZ et al, 2005).

¹ Informação fornecida pela Doutora Ana Lúcia Penteadó, pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, no Rio de Janeiro, em julho de 2013.

2.2.1 Conservantes químicos

A legislação brasileira inclui os Conservantes utilizados em alimentos à lista de aditivos alimentares, e os define como “substância que impede ou retarda a alteração dos alimentos provocada por microrganismos ou enzimas” (BRASIL, 1997).

Aditivo Alimentar: qualquer ingrediente adicionado intencionalmente aos alimentos, sem propósito de nutrir, com o objetivo de modificar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais, durante a fabricação, processamento, preparação, tratamento, embalagem, acondicionamento, armazenagem, transporte ou manipulação de um alimento. Ao agregar-se poderá resultar em que o próprio aditivo ou seus derivados se convertam em um componente de tal alimento. Esta definição não inclui os contaminantes ou substâncias nutritivas que sejam incorporadas ao alimento para manter ou melhorar suas propriedades nutricionais (BRASIL, 1997).

Os agentes conservantes mais clássicos são os ácidos orgânicos, por exemplo, ácido acético, láctico, sórbico e benzóico. Estas substâncias são capazes de inibir o crescimento de células bacterianas e fúngicas. Há relatos na literatura de que o ácido sórbico também seria capaz de inibir a germinação e crescimento de esporos bacterianos. A ação antimicrobiana dos conservantes baseia-se em efeitos sobre um ou mais dos seguintes componentes/atividades: DNA, membrana plasmática, parede celular, síntese proteica, atividade enzimática, transporte de nutrientes (BRUL; COOTE, 1999).

A Tabela 1 apresenta os aditivos relatados como conservantes, além de outras funções de melhoramento nos produtos alimentares, atualmente permitidos e mais utilizados segundo o Codex Alimentarius (CODEX, 2013). Este documento é anualmente atualizado e é utilizado como referência pelo Ministério da Saúde através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2013b).

Tabela 1 Aditivos químicos com efeito de conservantes permitidos para uso em alimentos em geral (adaptado de CODEX, 2013)

INS *	ADITIVO
200	Ácido Sórbico
201	Sorbato de Sódio
202	Sorbato de Potássio
203	Sorbato de Cálcio
210	Ácido Benzóico
211	Benzoato de Sódio
212	Benzoato de Potássio
213	Benzoato de Cálcio
214	para-Hidroxibenzoato de Etil, Etilparabenzeno
218	para-Hidroxibenzoato de Metil, Metil parabeno
236	Ácido Fórmico
239	Hexametilenotetramina
242	Dicarbonato Dimetil
260	Ácido Acético
261	Acetato de Potássio
262	Acetato de Sódio
263	Acetato de Cálcio
280	Ácido Propiônico
281	Propionato de Sódio
282	Propionato de Cálcio
283	Propionato de Potássio
290	Dióxido de Carbono
384	Citrato de Isopropila
928	Peróxido de Benzoila

*Sistema Internacional de Numeração de Aditivos Alimentares
Adaptado de CODEX, 2013.

Embora conservantes químicos possam ser uma solução, sua utilização é controlada ou não é permitida, pois muitos deles como por exemplo o nitrito em determinadas concentrações, podem promover consequências negativas para a saúde humana, sendo questionada a liberação de sua utilização em alimentos (MILLS et al, 2011). A descoberta de novas substâncias antimicrobianas faz-se necessária devido ao desenvolvimento progressivo de resistência por microrganismos patogênicos contra antibióticos e conservantes químicos convencionais (KIM; WIJESEKARA, 2010). As bacteriocinas, em geral, são uma das opções

em um mosaico de possíveis mecanismos para controlar bactérias patogênicas e deteriorantes em alimentos (SCHULZ et al, 2009).

2.2.2 Peptídeos Bioativos

Nas últimas duas décadas, estudos abriram um novo campo de pesquisa que trata das substâncias bioativas ou biogênicas provenientes de alimentos (AGYEI, 2011; GOBBETTI, 2004), entre elas estão os peptídeos bioativos. Peptídeos são formados por aminoácidos ligados entre si através de ligações peptídicas (BELITZ; GROSCHE; SCHIEBERLE, 2009). Os poucos peptídeos bioativos caracterizados exibem uma grande diversidade em suas formas e funções (HARTMANN; MEISEL, 2007). Inúmeras definições têm sido dadas para peptídeos bioativos e uma das mais apropriadas poderia ser a seguinte: tratam-se de componentes de alimentos que podem exercer uma atividade de regulação no organismo humano, independentemente das suas funções nutritivas (GOBBETTI; MINERVINI; RIZZELLO, 2004).

Na última década, extensa evidência científica foi fornecida para a existência de peptídeos bioativos e proteínas derivadas de alimentos que podem ter efeitos benéficos sobre a saúde humana (BIZIULEVIČIUS, 2006; GOBBETTI, 2004; MILLS, 2011). Numerosas pesquisas têm descrito diferentes atividades fisiológicas e metabólicas após ensaios, *in vivo* e *in vitro*, com proteínas e peptídeos bioativos. Dentre os mais estudados encontram-se os efeitos antimicrobiano, antioxidante, anti-hipertensivo ou inibidor de enzima conversora de angiotensina (ECA), imunomodulador, opiáceo, osteoprotetor, de redução do colesterol, antitrombótico e de aumento da absorção/biodisponibilidade de minerais (AGYEI, 2011; CHOI, 2011; KAPEL, 2006; LIEPKE, 2003; MINE, 2004). Peptídeos inibidores de ECA, fosfopeptídeos derivados da caseína e peptídeos imunomoduladores estão entre os peptídeos bioativos mais utilizados para a aplicação em produtos alimentícios formulados para prover benefícios específicos à saúde (FRANCO, O., 2011).

2.2.2.1 Peptídeos antimicrobianos e Bacteriocinas

Peptídeos antimicrobianos (PAMs) são componentes importantes da defesa inata, porque além de eliminar microrganismos, eles são capazes de modular a resposta inflamatória (GOBBETTI; MINERVINI; RIZZELLO, 2004). Estes peptídeos podem ser encontrados em

todos os organismos multicelulares (BIZIULEVIČIUS et al, 2006). Tanto os animais quanto as plantas possuem peptídeos que desempenham esta atividade antimicrobiana de amplo espectro e os utilizam para defender-se de uma gama de microrganismos, incluindo bactérias, fungos, vírus e protozoários (BATISTA et al, 1999).

Com o crescente conhecimento das atividades fisiológicas de peptídeos bioativos, o interesse comercial em usá-los como ingredientes ativos em alimentos e medicamentos vem aumentando continuamente. O desenvolvimento de tecnologia para produção em larga escala desses peptídeos está progredindo. Alguns peptídeos bioativos inclusive já são usados no desenvolvimento de produtos alimentares e medicamentos (FRANCO, O., 2011). PAMs produzidos sinteticamente estão se tornando mais importantes à medida que os pesquisadores procuram métodos inovadores para o controle de doenças (RILEY; WERTZ, 2002).

Atualmente já foram identificados PAMs a partir de hidrolisados de inúmeras proteínas de origem alimentar, especialmente derivadas do leite (GOBBETTI; MINERVINI; RIZZELLO, 2004), porém proteínas contendo essa atividade biológica são também encontradas nos ovos, na carne e em peixes, bem como em diferentes fontes vegetais de proteínas, como soja, trigo, entre outras (AGYEI; APOSTOLOPOULOS; DANQUAH, 2011). Grande parte dos PAMs que geram um benefício para a saúde são sintetizados pelas células do próprio organismo e outros o são a partir de moléculas derivadas de proteínas alimentares, que podem ser hidrolisadas por enzimas proteolíticas no trato digestivo *in vivo* (BIZIULEVIČIUS et al, 2006) ou *in vitro*, por proteases de diferentes origens. Animais, plantas e microrganismos são as principais fontes de enzimas utilizadas para a produção de peptídeos bioativos (FRANCO, O., 2011). Após a hidrólise enzimática de proteínas do alimento, como a caseína do leite (SALAMPESSY et al, 2010), são produzidos peptídeos que podem exercer diferentes atividades biológicas, como antimicrobiana (CONTRERAS et al, 2011). Peptídeos antimicrobianos geralmente possuem uma massa molecular abaixo de 10 kDa. Estes peptídeos podem ser gerados *in vitro* por hidrólise enzimática (KIM; WIJESEKARA, 2010).

A demanda dos consumidores por alimentos minimamente processados e produtos livres de aditivos vem gerando o desenvolvimento de embalagens antimicrobianas, utilizando peptídeos bioativos como bioconservantes (PEREZ ESPITIA et al, 2012). Embalagens bioativas para alimentos oferecem oportunidades inovadoras de explorar todo o potencial dos PAMs a fim de garantir a segurança alimentar (MINE; MA; LAURIAU, 2004). O uso de embalagens antimicrobianas é um dos métodos aplicados para prevenir a contaminação de

patógenos na superfície de produtos alimentares. Uma solução ideal para a indústria de alimentos superar os problemas de segurança alimentar e ambiental é incorporar substâncias antimicrobianas em revestimentos comestíveis (ESWARANANDAM; HETTIARACHCHY; JOHNSON, 2004).

As bacteriocinas são definidas como peptídeos catiônicos, produzidos por microrganismos, anfífilos, com, em geral, de 13 a 50 resíduos de aminoácidos, que apresentam ação letal (com ou sem lise celular) ou bacteriostática contra bactérias Gram-positivas e contra células vegetativas e esporos dos gêneros *Clostridium* e *Bacillus* (FRANCO, O., 2011). As bacteriocinas são produzidas, sobretudo, por linhagens de espécies dos gêneros *Pediococcus*, *Lactococcus* e *Lactobacillus* (SCHULZ et al, 2009).

O mecanismo de ação das bacteriocinas pode ocorrer de diferentes formas, sendo mais dependente dos fatores relacionados à espécie bacteriana e de suas condições de crescimento, do que de alguma característica relacionada à sua própria molécula. A ação pode promover um efeito letal bactericida, sem lise ou com lise celular, ou ainda inibir a multiplicação microbiana, com efeito bacteriostático (OLIVEIRA; SIQUEIRA; SILVA, 2012). As bacteriocinas não promovem alteração na qualidade sensorial do produto, observando-se o crescente interesse da indústria de alimentos sobre o potencial de utilização destes compostos em substituição aos conservantes químicos (NASCIMENTO; MORENO; KUAYE, 2008). Até o presente, a nisina consiste na única bacteriocina utilizada comercialmente como agente natural de conservação de alimentos. A molécula de nisina é um peptídeo de 34 aminoácidos, tendo como aminoácidos terminais a isoleucina (amino-terminal) e a lisina (carboxiterminal). Sua massa molecular é de 3,5 kDa (MELO de, 2005; OLIVEIRA, 2012).

Em estudo realizado por Eswaranandam et al (2004) foram avaliados os efeitos dos ácidos cítrico, láctico, málico e tartárico na atividade antimicrobiana de filmes de proteína de soja incorporados de nisina (205 IU/g) contra *L. monocytogenes*, *S. gaminara* e *E. coli O157:H7*. A incorporação de nisina permitiu a redução da espessura dos filmes, garantindo que fossem manuseados sem quebrar e aumentou a resistência dos filmes adicionados de ácidos orgânicos. Filmes de proteína de soja incorporados de ácido málico (2,6%) decresceram de 8,3; 9,0 e 8,9 UFC/mL de *L. monocytogenes*, *S. gaminara*, e *E. coli O157:H7* para 5,5; 3,0 e 6,8 UFC/mL, respectivamente. Os filmes obtidos poderão ser aplicados em uma variedade de produtos de carne, de frango e vegetais. Em outro estudo, filmes comestíveis de proteína isolada de soja contendo extrato de semente de pomelo (1% m/m), que é uma fruta cítrica, nisina (10,000 IU g⁻¹), e EDTA (0,16% m/m) foram capazes de

reduzir populações de *E. coli* 0157: H7, *Salmonella typhimurium* e *L. monocytogenes*, e poderão ter aplicações em vários produtos alimentícios (MINE; MA; LAURIAU, 2004).

Há indicação de que conservadores naturais, particularmente em adição ou combinação sinérgica com outros fatores e técnicas que já estão em uso, terão um papel importante em um futuro próximo, principalmente se estes agentes tiverem nos alimentos a mesma ação efetiva verificada em ensaios laboratoriais (SCHULZ et al, 2009).

2.3 OBTENÇÃO DE HIDROLISADOS PROTEICOS ATRAVÉS DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS

A forma mais comumente utilizada para produção de peptídeos bioativos *in vitro* é através da hidrólise enzimática de moléculas de proteína (KORHONEN; PIHLANTO, 2006). Peptídeos formados por hidrólise com proteases foram relatados por transportar bioatividades específicas, diferindo daqueles obtidos por outras hidrólises como, por exemplo, a hidrólise química (ZHONG et al, 2007). Através de clivagem de ligações peptídicas, a hidrólise enzimática pode diminuir a massa molecular, aumentando a reatividade e melhorando as propriedades funcionais de proteínas. O método enzimático é especialmente útil na obtenção de peptídeos muito curtos (oligômeros com de 2-5 monômeros) (SMACCHI; GOBETTI, 2000). Peptídeos bioativos são subsequentemente isolados através de ultrafiltração ou por resinas de troca iônica (ZASLOFF, 2002). Massa molecular é um parâmetro importante, que reflete a hidrólise de proteínas e é o que mais se correlaciona com a bioatividade de hidrolisados proteicos (YANG et al, 2011).

As condições operacionais empregadas no processamento de isolados proteicos, o tipo de protease e o grau de hidrólise afetam diretamente as atividades antioxidantes e biológicas (MOURE; DOMINGUEZ; PARAJO, 2006). A fonte inicial de proteína, a estratégia de produção utilizada e as condições de processamento, são os fatores que influem na obtenção de peptídeos com atividades biológicas distintas. Estudos mostram que, dependendo da enzima utilizada para hidrolisar a proteína de soja, obtêm-se peptídeos com propriedades anticarcinogênicas ou com atividade hipotensiva (KIM; PARK; RHEE, 1990). Ao hidrolisar as proteínas de arroz e soja, a tripsina originou peptídeos imunomoduladores que atuam estimulando ânions superóxidos (espécies reativas de oxigênio) que disparam sistemas de defesa imunológica inespecíficos (WANG; MEJIA; GONZALEZ, 2005).

O uso de enzimas diferentes resulta na formação de uma mistura de peptídeos com diversos graus de hidrólise e conseqüentemente diferentes atividades antioxidantes (SARMADI; ISMAIL, 2010). Proteinases (endopeptidases), tais como tripsina, pepsina, subtilisina, quimotripsina, termolisina, proteinase K, papaína e plasmina, além das combinações enzimáticas de proteinases – incluindo alcalase, pancreatina, e enzimas provenientes de bactérias e fungos – são comumente usadas para a hidrólise de proteínas dos alimentos gerando peptídeos bioativos (KORHONEN, 2006; WANG, 2005).

A papaína é uma protease extraída do látex dos frutos do mamoeiro (*Carica papaya*) pertencente ao grupo cisteína-proteases. Normalmente, a papaína apresenta atividade proteolítica em valores de pH de 5,0 a 9,0. Para os substratos caseína e albumina, seu pH ótimo de atuação é 7,0. Apresenta atividade sobre ligações éster e amida. Tem boa atuação na síntese de peptídeos e apresenta baixa especificidade de substrato (KOBBLITZ, 2008).

A pepsina é uma protease aspártica de origem animal, produzida pela mucosa do estômago na forma inativa de pepsinogênio. Torna-se ativa por autólise em pH abaixo de 5,0. Apresenta maior atividade na faixa de pH de 1,0 a 4,0, sendo seu pH ótimo de 1,8. Inativa-se completamente em pH superior a 6,0. Apresenta baixa especificidade, no entanto prefere ligações peptídicas que envolvam aminoácidos hidrofóbicos (KOBBLITZ, 2008).

Embora muitas vezes os peptídeos bioativos obtidos a partir da hidrólise enzimática de proteínas apresentem resultados promissores *in vitro*, apenas alguns dos benefícios esperados foram comprovados *in vivo*, em humanos (HARTMANN; MEISEL, 2007).

2.4 SOJA: CARACTERÍSTICAS E UTILIZAÇÃO

A soja é uma importante fonte de proteínas e uma potencial fonte de peptídeos bioativos (MEJIA de; LUMEN de, 2006). Em média, a soja contém cerca de 40% de proteínas, sendo essa concentração afetada por fatores genéticos e ambientais, e a composição deste percentual derivado de uma mistura complexa de tipos de proteínas diferentes. As proteínas de soja contêm todos os aminoácidos essenciais à nutrição humana, e mesmo tendo a metionina, a cisteína e provavelmente o triptofano em quantidades limitantes, acaba sendo um ótimo substituto para a proteína animal. O uso da soja na alimentação humana tem aumentado significativamente (MEJIA de; LUMEN de, 2006). A ingestão de soja é de interesse atual para a saúde humana devido ao seu potencial para diminuir o risco de doenças crônicas, como doenças cardiovasculares e câncer (BOLLING; BLUMBERG; CHEN, 2009).

Segundo a ANVISA, a proteína de soja encontra-se na lista de alimentos que possuem alegações de propriedade funcional aprovadas. A alegação permitida denota que: "O consumo diário de no mínimo 25 g de proteína de soja pode ajudar a reduzir o colesterol. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis" (BRASIL, 2013a).

A fração proteica da soja e sua classificação são bastante complexas. Relatos sobre tais assuntos nem sempre concordam. Além disso, diferentes sistemas de nomenclatura relativa a estas determinadas proteínas ou frações de proteínas são utilizados na literatura. Quando apropriadamente separadas em sistema tamponado, por ultracentrifugação, as proteínas da soja apresentam-se em quatro grupos, de acordo com sua velocidade de sedimentação: 2S (inibidores de tripsina e citocromo C), 7S (β -conglucina além de α -amilase, lipoxigenase e hemaglutininas que são lectinas), 11S (glicina livre) e 15S (glicina polimerizada). As principais proteínas componentes da soja são proteínas de reserva conhecidas como glicina e β -conglucina, que são globulinas e representam, respectivamente, 40 e 25% das proteínas de reserva do grão de soja (KOBLOITZ, 2011). De acordo com a solubilidade, as proteínas presentes em grãos são divididas em albuminas, globulinas, prolaminas e glutelinas. As albuminas são solúveis em água, as globulinas são solúveis em soluções salinas, as prolaminas em soluções alcoólicas e as glutelinas são insolúveis em água, soluções salinas e alcoólicas e solúveis em soluções ácidas ou alcalinas. As globulinas da soja são frações de proteína em que as subunidades se associam através de ligações de hidrogênio (THANH; SHIBASAKI, 1976). Em pH alcalino próximo a 10, globulinas se dissociam pois ocorre desnaturação da proteína (GUERRERO et al, 2011). Nos extremos de pH 2,0 ou 12,0, a dissociação em subunidades (alfa, beta e alfa 1) das proteínas é reversível (LIU, 1997). As proteínas da soja podem ainda ser divididas em proteínas com atividade biológica (enzimas, inibidores enzimáticos e hemaglutinas) que são solúveis e representam até 20% do total, e proteínas de reserva (KOBLOITZ, 2011; LIU, 1997).

O modelo atualmente aceito de glicina, que é uma das principais frações proteicas da soja, é uma proteína hexamérica (legumina) com uma massa molecular de aproximadamente 360 kDa. Seus monômeros têm a estrutura generalizada ASSB, em que A representa um polipeptídeo ácido de massa molecular de 34-44 kDa, B é um polipeptídeo básico com massa molecular de cerca de 20 kDa, e SS representa a ligação dissulfeto que liga os dois polipeptídeos (LIU, 1997). A β -conglucina é um trímero (vicilina) formado pelas seguintes subunidades: α de 57 kDa; α' de 57 kDa e β de 42 kDa, ricas em aspartato/asparagina,

glutamato/glutamina, leucina e arginina. Trata-se de uma glicoproteína que contém cerca de 5% de sua massa em carboidratos, em geral manose (KOBBLITZ, 2011).

O primeiro processo de extração aquosa de proteínas de soja para obtenção de concentrado de soja e isolado proteico de soja, foi descrito por Lawhon (1977 apud LIU, 1997) onde sementes de soja secas foram moídas e extraiu-se com água contendo peróxido de hidrogênio (para inativar a lipoxigenase) a uma temperatura de 60 ° C e pH 9, com posterior centrifugação do material para separação da fração proteica, emulsão de óleo e fibra residual.

Proteínas e peptídeos são responsáveis pela maioria das atividades biológicas/funcionais das sementes de leguminosas (MESA et al, 2008). As proteínas de soja têm sido amplamente utilizadas como ingrediente funcional em muitos alimentos processados por causa de sua eficácia em formar géis, dada à elevada capacidade de retenção hídrica, com alta qualidade nutricional, sensorial e fisiológica. Estudos encontraram na proteína de soja atividade hipocolesterolêmica maior do que na caseína (ZHONG et al, 2007). Hidrolisados de proteína de soja são fisiologicamente melhores do que proteínas intactas, pois sua absorção intestinal parece ser mais eficaz, devido ao aumento da solubilidade e do teor de peptídeo, tornando-os atraentes como fonte de aminoácidos ou peptídeos em nutrição humana (KONG et al, 2008).

2.4.1 Torta de soja: características, obtenção e utilização

Os óleos vegetais são produzidos em larga escala, das mais diversas matérias-primas, sendo o óleo de soja o segundo mais produzido mundialmente (USDA, 2013b). Torta é o resíduo deixado após a extração do óleo de sementes, castanhas ou amêndoas (ERICKSON, 1995).

Atualmente o Brasil é o terceiro maior produtor de óleo de soja, ficando atrás apenas de China e Estados Unidos. Sua produção de 7,1 mil toneladas no ano de 2013 (Tabela 2) já corresponde a 16,02% da produção mundial (USDA, 2013a). Apesar da grande produtividade, grande parte da soja é utilizada na extração de óleos e seus resíduos são destinados, especialmente, à alimentação animal (SILVA, M. et al, 2006).

Tabela 2 Principais Óleos Vegetais: Fornecimento e Distribuição Mundial

	2009/10	2010/11	2011/12	2012/13	Ago 2013/14
País produtor					
			Mil toneladas		
China	8,726	9,84	10,914	11,572	12,121
Estados Unidos	8,897	8,568	8,954	8,972	8,738
Brasil	6,47	6,97	7,31	6,76	7,1
Argentina	6,476	7,181	6,839	6,265	7,05
União Européia	2,29	2,246	2,226	2,267	2,22
Índia	1,32	1,675	1,71	1,73	1,78
México	643	648	657	653	680
Outros	3,967	4,154	3,945	4,488	4,631
Total	38,789	41,282	42,555	42,707	44,32

Traduzida e adaptada de USDA, 2013.

A torta de soja, um subproduto obtido durante o processamento de óleo de soja, apresenta-se como uma fonte de isoflavonas. No entanto, a variedade de outros componentes funcionais presentes na torta de soja permanece desconhecida (KAO; CHEN, 2006). Silva M. et al (2006) relataram a composição centesimal e o valor energético da torta de soja. Os resultados indicaram que o resíduo de soja possui uma boa qualidade química-nutricional, sendo fonte de carboidratos (33%), proteínas (47%), minerais (cinzas - 5%) e fibras (fibra bruta - 5%).

A proteína de soja pode ser extraída a partir da torta de soja. Durante este processo, a farinha de soja é obtida como um produto secundário e pode ser purificada para se obter concentrado de proteína de soja (SPC) que possui em sua composição aproximadamente 70% de proteínas, e da proteína isolada de soja (SPI) possuindo aproximadamente 90% de proteínas, que adicionaria valor nutricional e econômico a sub-produtos agrícolas (GUERRERO et al, 2011).

Guerrero et al (2011) relataram que gelatina incorporada a filmes baseados em SPI apresentam excelentes propriedades de barreira à luz UV, sugerindo que o efeito preventivo potencial de filmes baseados em SPI proporcionam o retardamento da oxidação do produto, induzida pela luz UV, e os valores de transparência encontrados são semelhantes aos medidos para filmes comerciais utilizados para fins de embalagem.

2.5 COMPOSTOS ORGÂNICOS ANTIMICROBIANOS EM VEGETAIS

Produtos naturais, tais como extratos de plantas, seja como compostos purificados ou como extratos brutos, oferecem possibilidades ilimitadas para o controle do crescimento microbiano devido à sua diversidade química (NEGI, 2012). As plantas produzem metabólitos secundários antimicrobianos, geralmente associados a peptídeos e proteínas de defesa, como parte de seu crescimento e desenvolvimento ou em resposta ao estresse ou ao ataque de patógenos. Estes metabólitos são uma alternativa promissora de antibióticos naturais, porque representam uma grande variedade de compostos que já demonstram atividade inibitória contra o desenvolvimento de diferentes microrganismos patogênicos (CABRAL, 2013; NASCIMENTO, 2003).

A eficácia de um composto antimicrobiano depende do tipo, gênero, espécie, e cepa do microrganismo alvo, além dos fatores ambientais tais como pH, atividade de água, temperatura, composição da atmosfera e da carga microbiana inicial do substrato. A natureza antimicrobiana dos fitoquímicos é determinada pelas suas propriedades químicas, tais como valor de pKa, os ratios de hidrofobicidade / lipofilicidade, solubilidade e volatilidade. O pH e polaridade são os fatores mais importantes que influenciam a eficácia antimicrobiana de uma substância proveniente de alimentos (NEGI, 2012).

As pesquisas sobre a utilização de agentes antimicrobianos naturais em alimentos vêm crescendo constantemente. Porém, a falta de reprodutibilidade da atividade antimicrobiana destes compostos é um dos principais obstáculos encontrados. Variações qualitativas e quantitativas no conteúdo de fitoquímicos bioativos em extratos vegetais resultam em sua eficácia inconstante. Além disso, a maioria dos estudos utiliza extratos brutos de vegetais, que geralmente contem outras substâncias interferentes, como flavonoides na forma glicosídica, onde o açúcar presente neles diminui a eficácia da atividade contra algumas bactérias (NEGI, 2012).

2.5.1 Fitoalexinas

Dentre os compostos bioativos sintetizados nas plantas, que formam barreiras químicas na forma de moléculas antimicrobianas, incluem-se as fitoalexinas. Estudos comprovaram que extratos de plantas obtidos com diferentes solventes, bem como óleos essenciais, são ricos nestes compostos (BONATO, 2007; CABRAL, 2013).

Fitoalexinas constituem um grupo heterogêneo de compostos químicos de baixa massa molecular, sintetizados por plantas em resposta a estresses físicos, químicos ou biológicos, que possuem atividade antimicrobiana (AHUJA, 2012; CLEVELAND, 2010; MAZARO, 2008; NWACHUKWU, 2013). Elas possuem grande diversidade, sendo que mais de 300 tipos já foram caracterizados entre diferentes classes de compostos químicos, como cumarinas, diterpenos, flavonoides, taninos, dentre outros (CABRAL, 2013; MAZARO, 2008).

O estudo e a síntese de fitoalexinas, especialmente em espécies nativas, abrem enormes perspectivas para descoberta de novos produtos naturais com atividade antimicrobiana e cujas estruturas podem servir como modelo para a síntese química de defensivos agrícolas naturais. Desde sua descoberta, inúmeras fitoalexinas foram obtidas de vegetais como feijão, soja, ervilha, batata, tomate, alface, algodão, arroz, cevada, banana, entre outras (MAZARO et al, 2008). A soja contém várias fitoalexinas, incluindo as isoflavonas compostas pelas agliconas daidzeína e genisteína (CLEVELAND et al, 2010). A fitoalexina gliceolina (pterocarpano) presente na soja, mostra-se importante na interação dessa leguminosa com fitopatógenos, sendo que a utilização de cotilédones de soja mostrou-se como excelente ferramenta para estudos envolvendo capacidade gerar respostas de defesa contra moléculas de origem biológica, química ou física (MAZARO et al, 2008).

2.5.1.1 Gliceolina

Os pterocarpanos representam a segunda maior classe de isoflavonoides da soja, depois das isoflavonas. Apresentam um núcleo tetracíclico derivado do núcleo fundamental das isoflavonas (Figura 1), mas apresentam uma numeração diferente das isoflavonas. São subdivididos em pterocarpanos, 6-hidroxi-pterocarpanos e pterocarpenos. A maior ocorrência dos pterocarpanos é nos gêneros *Erythrina*, *Glycine*, *Sophora* e *Swartzia* (SIMÕES et al, 2005).

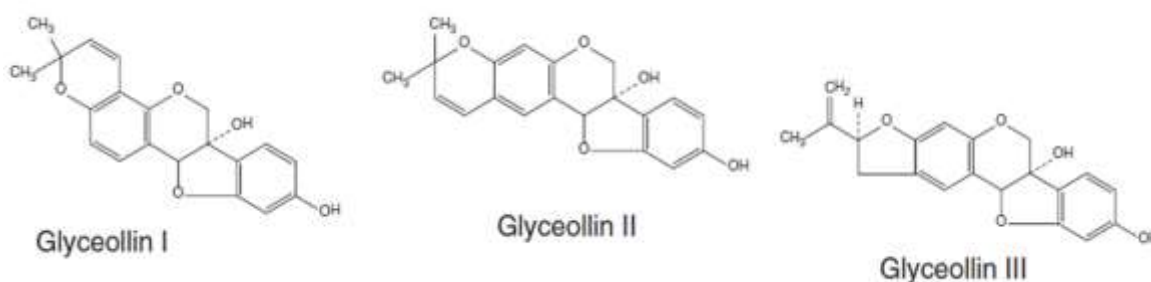


Figura 1 Estruturas químicas de fitoalexinas soja: gliceolinas I, II e III (Nwachukwu, 2013).

O pterocarpan gliceolina, presente na soja, existe predominantemente sob a forma de três isômeros, conhecidos como gliceolinas I, II e III (Figura 1). Os três isômeros contêm cada um, dois centros quirais dentro da sua estrutura, resultando em quatro enantiômeros possíveis (RR, RS, SR, SS) para cada um dos compostos, sendo apenas a configuração de enantiômero SS a que ocorre naturalmente (NWACHUKWU, 2013). Dentre as atividades biológicas da gliceolina, são incluídas ações antimicrobiana e anti-tumoral. A inoculação de microrganismos durante o processo de germinação da soja induz a maior produção de gliceolina, embora a quantidade resultante seja dependente do tipo de microrganismo usado (AHUJA, 2012). As gliceolinas são produzidas a partir da mesma via e dos mesmos precursores bioquímicos e o acúmulo de gliceolina na soja pode ocorrer devido às necessidades biológicas e específicas das sementes em resposta a estímulos externos, ou através da indução de sua produção pela utilização dos potenciadores, sendo a aplicação de fungos para tal efeito a mais investigada (NWACHUKWU, 2013).

2.5.2 Fitoanticipinas

As plantas saudáveis exibem componentes de defesa presentes constitutivamente, caracterizadas por estruturas histológicas ou pelo acúmulo de uma variedade de substâncias antibióticas, também chamadas de fitoanticipinas. Estas incluem vários compostos secundários pré-formados tais como os terpenóides ou fenólicos (BONATO, 2007). Alguns metabólitos secundários como os glicosídeos cianogênicos, os glicosinolatos e algumas saponinas são estocados nas células das plantas como precursores inativos, e são convertidos em antibióticos biologicamente ativos pelas enzimas das plantas em resposta ao ataque de patógenos (NASCIMENTO, D., 2003). Vários metabólitos das espécies de vegetais, tais

como, alcalóides, saponinas, taninos e os esteróis foram previamente associados com a atividade antimicrobiana (LEE, 2006).

2.5.2.1 Saponinas

Saponinas, são glicosídeos formados por uma porção lipídica (sapogenina), que pode ser composta por um esteróide ou um triterpeno, ligada à glicoses, galactoses e/ou a pentoses, e estão presentes no grão de soja em concentrações consideradas elevadas (6,5g/Kg) (KOBBLITZ, 2011). O comportamento anfifílico das saponinas e a capacidade de formar complexos com esteróides, proteínas, e fosfolípidos de membrana, determinam nesta substância um número de diferentes propriedades biológicas. Conseqüentemente, estas apresentam uma variedade de efeitos biológicos, tais como antifúngico, antimicrobiano, antiparasitário, anti-inflamatório, analgésico, expectorantes, antioxidante, espermicida, e ação de redução do colesterol. Embora tenha efeitos biológicos mencionados, não há nenhum relato sobre o consumo de saponina (ALBERICE, 2012). Apresentam ação antifúngica relacionada à sua capacidade de interagir com as membranas celulares provocando a formação de poros (NASCIMENTO, D., 2003). Alguns trabalhos recentes atribuem às saponinas de leguminosas atividades antitumoral e anticancerígena, além da propriedade de reduzir os níveis de colesterol sérico, provavelmente em virtude da sua capacidade de ligar ácidos biliares e colesterol no intestino (KOBBLITZ, 2011).

2.6 UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS INDUSTRIAIS

A indústria de alimentos produz uma série de resíduos com alto valor de reutilização. Inúmeros estudos utilizando resíduos industriais do processamento de alimentos têm sido realizados com o objetivo de aproveitá-los. Com isso, minimiza-se o impacto ambiental destes tipos de indústrias na região onde estão situadas e ainda agrega-se valor aos sub-produtos gerados. Podemos utilizar os resíduos da industrialização da mandioca como exemplo dos resíduos que possuem diversas utilidades, sendo aproveitados na alimentação animal de bovinos, suínos e aves; para a produção de fibras dietéticas e produtos fermentados, como substrato microbiano; na produção de vitaminas, compostagem, fertilizantes, herbicidas entre outras (ZORTÉA, 2012).

Os resíduos da produção de óleo comestível, também conhecidos como tortas, possuem um valor nutritivo elevado, especialmente por ter um conteúdo de proteína variando de 15% a 50% (SIRCAR; SRIDHAR; DAS, 1998). Devido a seu alto teor proteico, este material tem um forte potencial para servir como fonte de proteína vegetal para o consumo humano, porém na maioria das vezes é utilizado como ração animal, principalmente para ruminantes e peixes (MA et al, 1996). Um estudo recente desenvolveu barras alimentícias com farinha do resíduo da soja, sendo a amostra com concentração de 20% desta farinha, a de maior aceitabilidade. As barras produzidas apresentaram boa qualidade microbiológica e propriedades físico-químicas atrativas, bem como boa aceitabilidade pelos provadores (CUNHA et al, 2010).

Os bagaços (resíduos do processamento de alimentos de origem vegetal) são ricos em conteúdo de fibras, proteína e energia. Eles oferecem vantagens potenciais quando usados como substrato para o desenvolvimento de bioprocessos para a produção de produtos químicos orgânicos e biomoléculas. Estudos utilizando-os para a produção de enzimas industriais têm mostrado resultados promissores (RAMACHANDRAN et al, 2007). Tortas de óleos também vêm sendo utilizadas para a produção industrial de enzimas, antibióticos, biopesticidas, vitaminas e outras substâncias bioquímicas. Elas também têm sido utilizadas na fabricação de suplementos alimentares (SIRCAR; SRIDHAR; DAS, 1998). Quando o resíduo vegetal é descartado inadequadamente, pode ocasionar problemas ambientais por conter em suas fibras cerca de 25% de celulose, hemicelulose e lignina que são macromoléculas de difícil biodegradação no meio ambiente. (CUNHA et al, 2010). Além de criar potenciais problemas ambientais, os resíduos representam perdas de matérias-primas e energia, exigindo investimentos significativos da indústria em tratamentos para controlar a poluição (ZORTÉA, 2012).

Atualmente, há um crescente interesse na biotransformação de resíduos, tendo em vista, serem materiais de baixo custo e altamente renováveis. Deste modo, a utilização de resíduos, além de diminuir o impacto sobre o meio ambiente, pode ser um fator importante para a produção de subprodutos e diminuição nos custos de produção (PANDEY; SOCCOL; MITCHEL, 2000).

3 OBJETIVO GERAL

Desenvolver procedimento metodológico para extrair e hidrolisar proteínas da torta de soja, resíduo da extração do óleo. A partir disto, testar os diferentes hidrolisados obtidos contra os agentes microbianos.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Aperfeiçoar o processo de extração de proteínas hidrossolúveis da torta de soja.

Otimizar a obtenção de hidrolisados proteicos da torta de soja.

Avaliar o rendimento da reação de hidrólise das proteínas da torta de soja.

Avaliar a massa molecular das proteínas e dos peptídeos obtidos.

Avaliar a atividade antimicrobiana dos hidrolisados proteicos obtidos da torta de soja contra *Salmonella* Enteritidis, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella Brasil* e *Escherichia coli*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O desenvolvimento do presente trabalho ocorreu prioritariamente no Laboratório de enzimas (Núcleo de Bioquímica Nutricional), na Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO). Este laboratório está sob responsabilidade da professora Doutora Maria Gabriela Bello Koblitz do Departamento de Tecnologia dos Alimentos. As análises realizadas para avaliação da atividade antimicrobiana dos hidrolisados ocorreram no Laboratório de Microbiologia da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Agroindústria de Alimentos) sob a responsabilidade da pesquisadora Doutora Ana Lúcia Penteado. Os ensaios de eletroforese foram realizados no Laboratório de Bioquímica da Embrapa Agroindústria de Alimentos, com a colaboração da responsável, a pesquisadora Doutora Marília Penteado Stephan.

4.1 MATERIAL

4.1.1 Material Vegetal

A torta de soja, resíduo industrial obtido da extração de óleo de soja, foi obtida através da doação de Empresa multinacional processadora de óleo de soja em Mato Grosso, Brasil. Este material nos foi enviado seco, desengordurado e dessolventizado para realização dos ensaios.

4.1.2 Microrganismos

Cepas padrão de *Salmonella* Enteritidis (American Type Culture Collection (ATCC) 13076), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19117), *Staphylococcus aureus* (ATCC 14458), *Bacillus cereus* (ATCC 33019), *Salmonella Brasil* e *Escherichia coli* (ATCC 10799) provenientes da coleção de culturas do laboratório de Microbiologia de Alimentos da Embrapa Agroindústria de Alimentos, foram utilizadas neste estudo.

4.1.3 Reagentes e meios de cultura

Os reagentes químicos utilizados, como sais, ácidos, bases, álcoois, bem como os padrões de massa molecular para eletroforese, foram adquiridos de empresas com reconhecido padrão de qualidade como Merk® e Sigma®, e em nível analítico.

Os meios de cultura, sólidos (ágar) e caldos, também mantiveram o alto padrão de qualidade, sendo adquiridos de empresas como Difco®, Oxoid®, Merk®, Sigma®.

4.1.4 Enzimas

As enzimas proteolíticas purificadas utilizadas foram adquiridas das seguintes empresas: papaína MERK® e pepsina SIGMA®.

4.2 METODOLOGIA

4.2.1 Otimização da extração de proteínas hidrossolúveis da torta de soja

Foi realizado um planejamento experimental (rotacional central) com o objetivo de otimizar as condições da extração das proteínas da torta de soja. Para tal, foram utilizados como variáveis independentes o pH (4,0 – 8,0) e a concentração de NaCl (0,0 – 2,0 M).

Realizou-se a extração das proteínas hidrossolúveis a partir de três proporções de massa (g) de torta por volume (mL) de solução tampão, sendo elas: 5g/30 mL, 8,33 g/50 mL e 5g/100 mL nos diferentes valores de pH e concentração de NaCl, conforme indicado pelo planejamento experimental (Tabela 3). A torta desengordurada foi moída e homogeneizada em liquidificador durante 2 minutos e posteriormente filtrada em filtro de algodão. Este filtrado foi submetido à centrifugação a 4.000xg durante o período de 15 minutos.

A determinação da concentração de proteínas, em g/100g de torta, foi realizada pelo método de Lowry et al (1951) (descrito no item 4.2.5).

Tabela 3 Planejamento experimental (rotacional central) para otimização da extração de proteínas da torta de soja

Ensaio	pH	NaCl (M)
1	4,6	0,3
2	4,6	1,7
3	7,4	0,3
4	7,4	1,7
5	4	1
6	8	1
7	6	0
8	6	2
9 (C)	6	1
10 (C)	6	1
11 (C)	6	1
12 (C)	6	1

(C) Repetição dos pontos centrais; (M) Molaridade

4.2.2 Isolamento de proteínas solúveis da torta de soja

A extração das proteínas hidrossolúveis foi realizada a partir da proporção de 5 g de torta de soja por 100mL de solução tampão em valor de pH 9,0. A torta desengordurada foi moída e homogeneizada em liquidificador durante 2 minutos e posteriormente filtrada em filtro de algodão. Este filtrado foi submetido à centrifugação a 4.000xg durante o período de 15 minutos.

A determinação da concentração de proteínas, em g/100g de torta, foi realizada pelo método de Lowry et al (1951) (descrito no item 4.2.5).

Foram separadas alíquotas de 200 mL do extrato proteico para cada ensaio de hidrólise. Como o extrato encontrava-se em pH 9,0, foram utilizadas soluções de HCl 0,5M e NaOH 0,5M para ajustar o pH, até alcançar o valor de pH do ensaio (4,0; 7,0 e 10,0 para hidrólise realizada com papaína e 2,0 e 5,0 para pepsina). Para manter a estabilidade do pH da solução, foram adicionados 50 mL de solução tampão no valor de pH específico de cada reação de hidrólise.

4.2.3 Teste preliminar de obtenção dos hidrolisados

Foram testadas duas diferentes enzimas proteolíticas comerciais: papaína (protease neutra de origem vegetal) e pepsina (protease ácida de origem animal). Inicialmente foi realizado um teste exploratório (planejamento fatorial completo 2ⁿ), conforme mostra a Tabela 4, utilizando como fatores de variação para a papaína: a razão entre mg de enzima e mg de proteína (1:66,66; 1:100 e 1:200); tempo de reação (1, 3 e 5 horas); temperatura de reação (30, 50 e 70°C) e valor de pH (4,0; 7,0 e 10,0) (CONTRERAS et al, 2011). Como variável dependente (resposta) foram utilizados os resultados da avaliação da atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes* e *S. Enteritidis*.

Tabela 4 Planejamento fatorial completo 2ⁿ para o teste exploratório de obtenção dos hidrolisados

Ensaio	pH	Temperatura (°C)	Tempo de reação (h)	Relação enzima/proteína (p/p)
1	4,0	30	1	1/200 (0,005)
2	10,0	30	1	1/200 (0,005)
3	4,0	70	1	1/200 (0,005)
4	10,0	70	1	1/200 (0,005)
5	4,0	30	5	1/200 (0,005)
6	10,0	30	5	1/200 (0,005)
7	4,0	70	5	1/200 (0,005)
8	10,0	70	5	1/200 (0,005)
9	4,0	30	1	1/66,66 (0,015)
10	10,0	30	1	1/66,66 (0,015)
11	4,0	70	1	1/66,66 (0,015)
12	10,0	70	1	1/66,66 (0,015)
13	4,0	30	5	1/66,66 (0,015)
14	10,0	30	5	1/66,66 (0,015)
15	4,0	70	5	1/66,66 (0,015)
16	10,0	70	5	1/66,66 (0,015)
17 (C)	7,0	50	3	1/100 (0,010)
18 (C)	7,0	50	3	1/100 (0,010)
19 (C)	7,0	50	3	1/100 (0,010)
20 (C)	7,0	50	3	1/100 (0,010)

(C) Repetição dos pontos centrais

Para este teste foi realizada a metodologia descrita no item 4.2.4, utilizando as diferentes variáveis em questão.

A reação de hidrólise utilizando pepsina ocorreu respeitando os seguintes valores de cada fator: razão de 1,0 mg de enzima para 66,66 mg de proteína; tempo de reação de 1 hora;

temperatura de reação de 50°C e variação de pH nos valores de 2,0 e 5,0, determinados levando-se em consideração que a pepsina torna-se ativa por autólise em pH abaixo de 5,0. Além disso, diversos trabalhos citaram o pH ótimo da atividade proteolítica ocorrendo em pH 2,0 (GOBBETTI, 2004; PEÑA-RAMOS, 2002; NEVES, 2004; KOBLITZ, 2008).

4.2.4 Obtenção dos hidrolisados

Duzentos e cinquenta mililitros de solução de proteínas extraídas de torta de soja (conforme descrito no item 4.2.2) foram aquecidos a 95°C por 15 minutos, para provocar desnaturação das proteínas e facilitar a ação enzimática. Em seguida, as amostras foram resfriadas em banho de gelo até a temperatura de ensaio e mantidas em banho de aquecimento na temperatura indicada. A enzima especificada (papaina ou pepsina), na concentração correta, foi então adicionada, dando início à reação. Para paralização da reação, após o período de tempo e sob a temperatura determinados, o meio reacional foi aquecido a 100°C por 10 minutos e resfriado em banho de gelo. O produto obtido foi neutralizado a pH 7,0 (utilizando HCl 0,5M e NaOH 0,5M), centrifugado a 13.000xg por 15 minutos e o sobrenadante, contendo os peptídeos resultantes da hidrólise, foi aliquoteado, congelado e liofilizado (CONTRERAS et al, 2011).

Para cada um dos hidrolisados, nas diferentes condições de hidrólise, foi feito um “branco”, sendo este uma amostra de extrato de soja submetida ao mesmo processo que o hidrolisado (ajuste do valor de pH correspondente, tratamentos térmicos, tempo de reação de hidrólise), porém sem adição de enzima.

4.2.5 Avaliação do rendimento da reação de hidrólise

O rendimento da hidrólise (RH) foi calculado segundo a metodologia descrita por Zhong et al (2007), levando em consideração a concentração de proteínas hidrossolúveis (aminoácidos e peptídeos) no sobrenadante final e a concentração de proteínas hidrossolúveis no substrato inicial da reação, seguindo a equação expressa a seguir:

$$RH = \frac{[final] - [inicial]}{[inicial]} * 100$$

A precipitação de proteínas não hidrolisadas foi realizada através da utilização de uma solução constituída da mistura de ácido tricloroacético 0,11 M, acetato de sódio 0,22 M e ácido acético 0,33M, por ser considerada esta a melhor forma de estimar a atividade de proteinases segundo o estudo descrito por Murthy et al (1997). A mistura foi acrescida à amostra em uma proporção de 1:1, e deixada em repouso por 15 minutos, com posterior centrifugação a uma velocidade de 4.000xg durante 15 minutos.

Para determinação da concentração de proteína nas amostras foi utilizado o método de Lowry et al (1951). Meio mililitro da amostra foi acrescido de 5 mL da mistura reativa contendo carbonato de sódio anidro, hidróxido de sódio, sulfato de cobre e tartarato de sódio. Após período de 10 minutos foi adicionado reagente de Folin-Ciocalteu diluído 1:3, e após novo período de 10 minutos a absorbância da solução foi avaliada a 660nm. O resultado foi quantificado com base em uma curva padrão de albumina de soro bovino.

4.2.6 Avaliação da massa molecular das proteínas utilizadas e dos peptídeos obtidos

Foi utilizado um sistema de eletroforese, segundo a metodologia de preparação dos géis descrita por Laemmli (1970) para avaliar proteínas de maior massa molecular e a metodologia descrita por Schägger e Von Jagow (1987) para avaliar os peptídeos resultantes da hidrólise, com menor massa molecular.

4.2.6.1 SDS-PAGE

Cada amostra liofilizada foi pesada em 20 mg e solubilizada em 2 mL de tampão de amostra (Tabela 5) sob agitação contínua no vortex por 1 min e posteriormente aquecidas por 10 min a 100°C.

Tabela 5 Composição do tampão de amostra para SDS-PAGE

Componente	Volume
Água destilada	11,4 mL
0,05M tris-HCl pH 6,8	3 mL
Glicerol	2,4 mL
SDS 10% (p/v)	4,8 mL
2-mercaptoetanol	1,2 mL
Azul de bromofenol	1,2 mL

Para o gel de corrida foi utilizada acrilamida, na concentração de 12%, e para o gel de aplicação da amostra esta foi utilizada na concentração de 4%. A corrida foi realizada pelo período de sete horas sob uma tensão de 100 v. Os marcadores de massa molecular utilizados foram obtidos a partir dos seguintes padrões de proteínas (em kDa): 101,36 (fosforilase); 72,89 (albumina bovina); 47,82 (ovalbumina); 33,98 (anidrase carbônica); 26,84 (inibidor de tripsina de soja); 17,62 (lisozima). As proteínas dos géis foram coradas com o reagente de cor “coomassie blue R250”, durante uma noite, e descoradas com uma solução contendo: 40% de metanol, 10% de ácido acético e 50% de água, por um período de três horas, para visualização das bandas (LAEMMLI, 1970).

4.2.6.2 SDS-PAGE Tris-Tricina

A eletroforese em gel de poli(acrilamida em presença de Tricina (SDS-PAGE Tris-Tricina) foi realizada seguindo o método de Schägger e Von Jagow (1987). A solução estoque de acrilamida/bisacrilamida (49,5%T; 3%C) foi preparada na concentração de 16,5% T e 3% C, e o gel de concentração, 4% T e 3% C, em que T corresponde à somatória das percentagens de acrilamida e bisacrilamida em relação ao volume do gel, e C, à relação em peso entre a concentração de bisacrilamida e a soma das concentrações (%) de ambos os monômeros (SCHÄGGER; VON JAGOW, 1987).

As amostras liofilizadas foram pesadas em 20 mg e solubilizadas em 2mL de tampão de amostra (Tabela 6) sob agitação contínua no vortex por 1 min, aquecidas por 10 min a 100°C. Após este procedimento, as amostras foram aplicadas no gel e a corrida eletroforética foi desenvolvida a uma voltagem constante de 60 V por aproximadamente 6 horas. Para identificar e calcular as massas dos peptídeos obtidos, foi aplicado no gel de corrida um padrão de ultra-baixa massa molecular, com as seguintes massas (em kDa): 26,63 (triose-fosfato isomerase); 16,95 (mioglobina); 14,44 (α -lactalbumina); 6,51 (aprotinina); 3,49 (insulina β -oxidada); 1,42 (bacitracina).

Tabela 6 Composição do Tampão de Amostras para SDS-Tricina-PAGE

Componentes	Volume
SDS 10% (p/v)	4 mL
Glicerol	0,95 mL
0,5M tris-HCl pH 6,8	1 mL
2-mercaptoetanol (v/v)	0,2 mL
Comassie blue G250	0,001g
Água milli-q	3,85 mL

4.2.7 Avaliação da atividade antimicrobiana dos hidrolisados contra *Salmonella* Enteritidis, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella* Brasil e *Escherichia coli*.

A atividade antimicrobiana dos hidrolisados proteicos foi avaliada através de dois métodos, o método qualitativo de Difusão em Poços de Ágar, e o método quantitativo de Macrodiluição em Caldo para Concentração Inibitória Mínima, descritos a seguir.

4.2.7.1 Diluição das amostras liofilizadas

As amostras foram diluídas em solução tampão fosfato pH 7,0 respeitando a proporção de 1:1 (1g amostra/1mL tampão).

4.2.7.2 Método de Difusão em poços de ágar

Culturas puras de *S. Enteritidis*, *S. aureus*, *S. Brasil*, *E. coli* e *B. cereus* foram ativadas em ágar TSA (Trypticase Soy Agar), e *L. monocytogenes* em ágar TSA-YE (Trypticase Soy Agar with Yeast Extract), incubadas às temperaturas ótimas de crescimento de cada microrganismo (37°C, 35°C, 37°C, 35°C, 30°C e 30°C, respectivamente), por três intervalos consecutivos de 24h, imediatamente antes da sua utilização no experimento. As células de cada microrganismo foram então coletadas e transferidas para 5 mL de solução salina (NaCl 0,85%) para ajustar as suspensões em concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL de acordo com a escala McFarland de turbidez, com o auxílio de aparelho medidor de turbidez Densimat (bioMerieux). Foi realizada a diluição seriada de cada suspensão bacteriana (1:10) em água

peptonada 0,1% e 1 mL de cada diluição foi plaqueado pelo método “pour plate”, em ágar TSA/TSA-YE, e incubado a 35°C por 24h para determinar a viabilidade celular na concentração esperada. Desta forma, foi possível padronizar-se os inóculos semeados ($1,5 \times 10^8$ UFC/g) para uso nos experimentos, que foram conduzidos mediante inoculação inicial de 200µl de cada suspensão em 200 mL de ágar estéril TSA/TSA-YE fundidos (45°C).

Os meios inoculados foram então distribuídos cuidadosamente em placas de Petri (triplicata) e deixados para secar em câmaras de fluxo laminar. Com auxílio de pipetas tipo Pasteur estéreis foram realizados poços nas placas e então adicionados a cada poço 50µl de solução de cada hidrolisado obtido, bem como de cada “branco” (amostras de extrato proteico da torta de soja, passados pelo mesmo processo que os hidrolisados, porém sem adição de enzima). As placas foram então incubadas nas temperaturas de crescimento de cada microrganismo e os diâmetros dos halos de inibição foram mensurados após 24h de incubação (WAN,1998; MARTIN, 2012).

Como controle negativo foram utilizados 50µl de tampão fosfato em pH 7,0 e como controle positivo 50µl de solução de clorexidina 0,12% (v/v).

4.2.7.3 Concentração Inibitória Mínima - Método de Macrodiluição (Tubo) em Caldo

Foram preparadas volumetricamente as diluições finais de hidrolisados em caldo Mueller-Hinton, seguindo o procedimento conveniente e confiável descrito nas Normas de Desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana (NCCLS, 2005) e apresentado na Tabela 7.

Tabela 7 Esquema de Preparação de Diluições de Agentes Antimicrobianos a Serem Usados em Testes de Sensibilidade por Diluição em Caldo

Passo	Solução do agente antimicrobiano Concentração (mg)	Fonte	Volume	Volume CAMHB*	Concentração final (mg)	Log ₂
1	149,71	estoque	1 mL	9 mL	14,97	9
2	14,97	Passo 1	1	1	7,49	8
3	14,97	Passo 1	1	3	3,74	7
4	14,97	Passo 1	1	7	1,87	6
5	1,87	Passo 4	1	1	0,94	5
6	1,87	Passo 4	1	3	0,47	4
7	1,87	Passo 4	1	7	0,23	3
8	0,23	Passo 7	1	1	0,12	2
9	0,23	Passo 7	1	3	0,06	1
10	0,23	Passo 7	1	7	0,03	0
11	0,03	Passo 10	1	1	0,01	-1
12	0,03	Passo 10	1	3	0,01	-2
13	0,03	Passo 10	1	7	0,00	-3

*CAMHB, caldo Mueller-Hinton
Adaptado de NCCLS, 2005.

O inóculo de *S. aureus* foi preparado a partir de uma suspensão 0,5 na escala McFarland ($1,1 \times 10^8$ UFC/mL), obtida com a ajuda do Densimat. Foi realizada a diluição até 10^{-3} para obtenção do inóculo final ($1,1 \times 10^5$ UFC/mL), confirmando este inóculo por meio de plaqueamento em placa de ágar TSA e incubação simultânea.

Acrescentou-se 1 mL de inóculo ajustado a cada tubo contendo 1 mL de agente antimicrobiano na série de diluições (e a um tubo de controle positivo contendo apenas caldo) até 15 minutos após a normatização do inóculo, misturando a seguir. Este procedimento resultou numa diluição 1:2 de cada concentração de antimicrobiano e uma diluição 1:2 do inóculo. Foi realizada leitura de turbidez no Densimat destes tubos e anotados os valores obtidos (“tempo zero”), sendo estes então incubados a 35°C por 20h. Realizou-se então uma nova leitura em Densimat após este período e, uma vez verificada diferença, foi feita comparação com os valores obtidos no “tempo zero” (NCCLS, 2003).

Houve ainda o plaqueamento em superfície pelo método “spread plate”, através da inoculação de 0,1 mL de cada uma das diluições em placas de Petri com auxílio da alça de

Drigalsky, utilizando-se do meio de cultura ágar TSA, para confirmação dos resultados obtidos.

4.2.8 Análise estatística

As planilhas de ensaio, avaliação dos resultados e a análise de superfície de resposta do processo metodológico foram elaboradas com auxílio dos softwares STATISTICA (7.0) e GraphPad Prism (5.0). Os ensaios foram avaliados por análise de variância seguida do teste de Tukey ($p < 0,05$) ou pela aplicação do teste de t ($p < 0,05$), quando apropriado.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO DAS PROTEÍNAS HIDROSSOLÚVEIS DA TORTA DE SOJA

Tratando-se da extração de proteínas hidrossolúveis da torta de soja, não havia conhecimento de qual seria o processo mais eficaz para a sua realização.

A começar pela proporção em g de torta por mL de solução tampão, aquela de 5g/ 30 mL (ALMEIDA et al, 2000) não permitiu uma boa homogeneização e conseqüentemente atrapalhou o processo de extração das proteínas. Para eliminar a suposição de que o pequeno volume de amostra teria dificultado a homogeneização, aumentou-se o volume de solução tampão proporcionalmente a quantidade de torta (8,33 g/50 mL). Os resultados obtidos (valor médio de 2,6 g de proteína por 100g de torta) indicaram que o conteúdo de proteínas do extrato estava abaixo das expectativas, considerando que o resíduo da soja teria um conteúdo total de proteínas consideradas solúveis de aproximadamente 13% (LIU, 1997; SILVA, M., 2006).

Optou-se então por diminuir a quantidade de torta em relação à de solução tampão, pois foi observado que quanto melhor a homogeneização, maior a extração e conseqüentemente o conteúdo de proteínas hidrossolúveis extraídas da torta de soja. Ficou estabelecida então a proporção de 5g de torta de soja para 100 mL de solução tampão (BOIA; KOBBLITZ, 2012). Condições semelhantes foram utilizadas por Radha et al (2007) que utilizaram uma proporção de 10g de farinha desengordurada de oleaginosas (soja, gergelim e amendoim) em 100 mL de solução, para obtenção de extrato proteico para posterior hidrólise enzimática.

O planejamento experimental realizado para otimização do processo de extração das proteínas hidrossolúveis da torta de soja (APÊNDICE A), levou em consideração as variáveis pH e concentração de NaCl, por serem fatores considerados interferentes na solubilidade de proteínas de soja e conseqüentemente na sua extração (LIU, 1997).

Os resultados do planejamento experimental (Figura 2) mostram que quanto mais alcalino o valor de pH da solução tampão utilizada e menor a quantidade de NaCl adicionado, melhor solubilidade das proteínas e, conseqüentemente, maior sua extração. Assim, os

melhores resultados de extração em proteínas /100 g das amostras foram obtidas em valor de pH 9,0 e sem a adição de NaCl, rendendo 11,33 g/100 g de torta de soja.

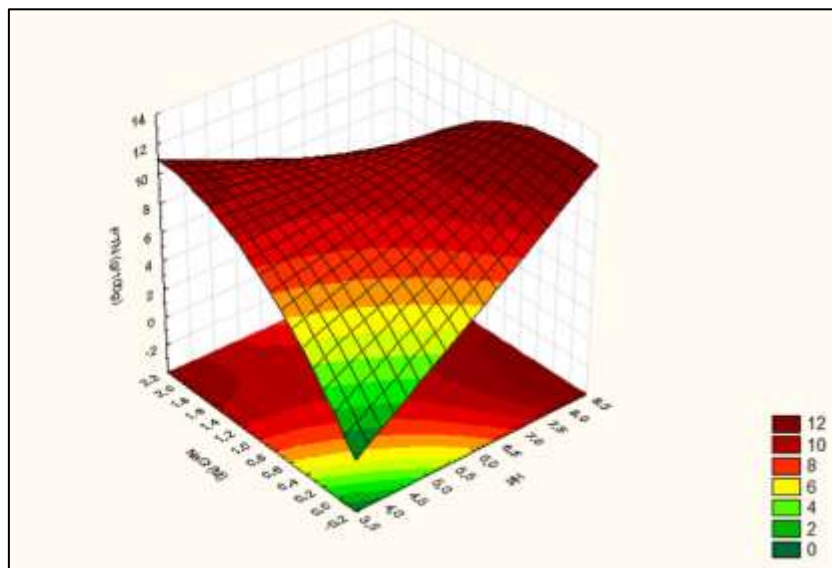


Figura 2 Superfície de resposta da otimização da extração de proteínas da torta de soja (Software Statistica 7.0)

Tabela 8 ANOVA: Otimização da Extração de Proteínas da Torta de Soja (Software Statistica 7.0)

	SQ	GL	MQ	Fcalc
Regressão	23,0109	4	5,7527	9,9804
Resíduo	4,0349	7	0,5764	F _{tab}
Falta de ajuste	3,8476	4		1% 7,85
Erro puro	0,1873	3		
Total	27,0458	11		

De acordo com os parâmetros estatísticos avaliados (Tabela 8), a análise da superfície de resposta é considerada confiável ($R^2 = 0,85081$), e os resultados obtidos são significativos com 99% de confiança ($p < 0,01$).

As principais proteínas da soja são globulinas, que por classificação são apenas solúveis em solução salina. Sendo assim, na presença de NaCl a solubilidade e consequentemente a extração das proteínas deveria aumentar, o que de fato ocorre como pode ser observado na Figura 2, quando o pH encontra-se mais ácido. Segundo Guerrero et al (2011), em pH alcalino as subunidades das globulinas se dissociam causando sua desnaturação, o que pode justificar o aumento da solubilidade e eficiência da extração na ausência de NaCl, mas em pH alcalino.

Tais resultados concordam com aqueles obtidos por Neves e colaboradores (2001), que ao avaliar a variação da solubilidade da proteína total da farinha de tremço em diferentes tipos e concentração de sais e a diferentes valores de pH, concluiu que os melhores resultados foram obtidos com os meios apresentando valores de pH alcalinos e que não se observaram diferenças significativas com o aumento da concentração dos sais.

Uma faixa de pH na qual se enquadra aquele encontrado no presente estudo, é utilizada no processo comercial para obtenção de SPI que se inicia, geralmente, com a extração levemente alcalina (pH 7-10) de proteínas, utilizando a farinha de soja desengordurada (LIU, 1997).

5.2 TESTE PRELIMINAR DE OBTENÇÃO DOS HIDROLISADOS

Partindo do princípio de que diversos fatores interferem na produção de materiais hidrossolúveis resultantes da hidrólise enzimática, foram levados em consideração para o planejamento e realização da hidrólise enzimática da torta de soja: substrato, pH, temperatura, tempo de incubação e concentração da enzima (MARTINS; COSTA; PRENTICE-HERNÁNDEZ, 2009). Os resultados do planejamento são mostrados reunidos no APÊNDICE B.

Os resultados da variável dependente (resposta) mostraram que havia atividade antimicrobiana para alguns dos tratamentos onde houve hidrólise enzimática com papaína, tanto para *L. monocytogenes* quanto para *S. Enteritidis*. Houve então a repetição dos melhores resultados, a fim de confirmá-los, e os maiores halos de inibição podem ser observados nas Figuras 3 e 4.

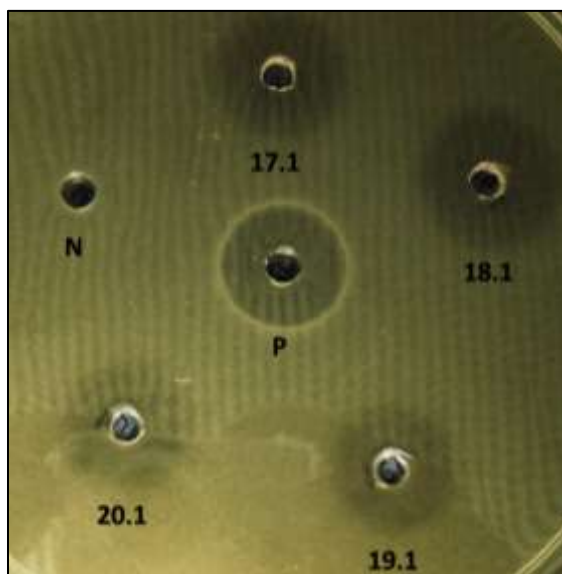


Figura 3 Atividade antimicrobiana de hidrolisados contra *L. monocytogenes*

P: Controle positivo; N: Controle negativo; 17.1, 18.1, 19.1 e 20.1: Hidrolisados de torta de soja com papaína em pH 7,0

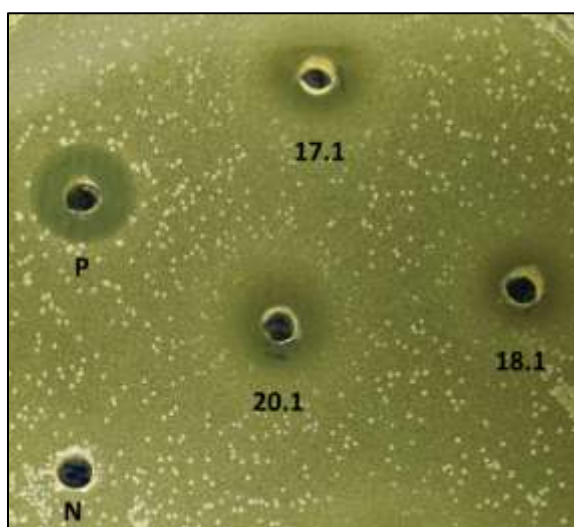


Figura 4 Atividade antimicrobiana de hidrolisados contra *S. Enteritidis*

P: Controle positivo; N: Controle negativo; 17.1, 18.1 e 20.1: Hidrolisados de torta de soja com papaína em pH 7,0

Temperatura e pH estão entre os mais importantes fatores ambientais que influenciam a atividade enzimática (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). Analisando estatisticamente os resultados do teste preliminar (APÊNDICE B), foi possível verificar, como mostram as Figuras 5 e 6, que o pH é única variável que interfere, de forma

significativa, na atividade antimicrobiana dos hidrolisados avaliados tanto contra *S. Enteritidis* quanto contra *L. monocytogenes*.

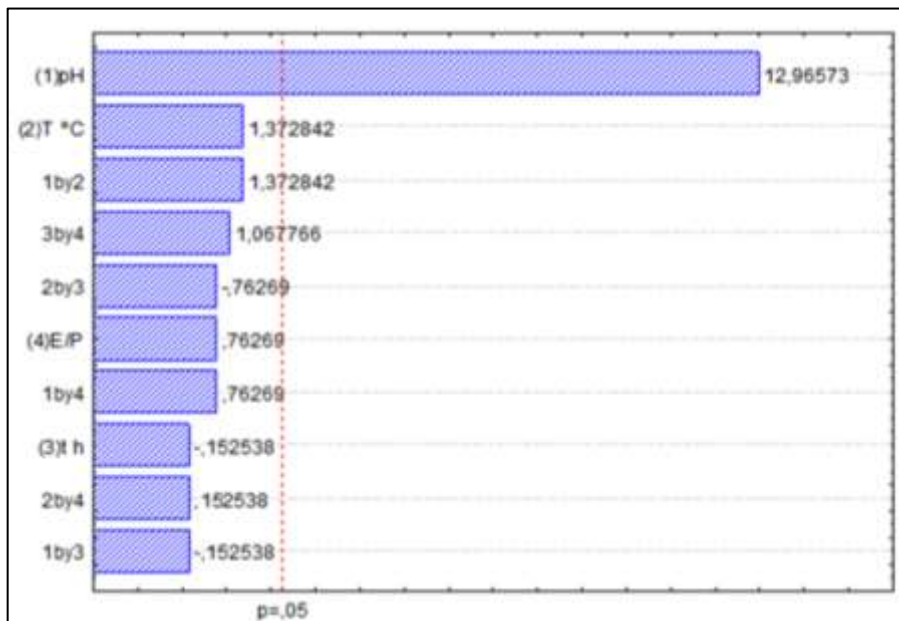


Figura 5 Diagrama de Pareto para análise das variáveis utilizadas no processo de hidrólise, pela atividade antimicrobiana contra *S. Enteritidis*

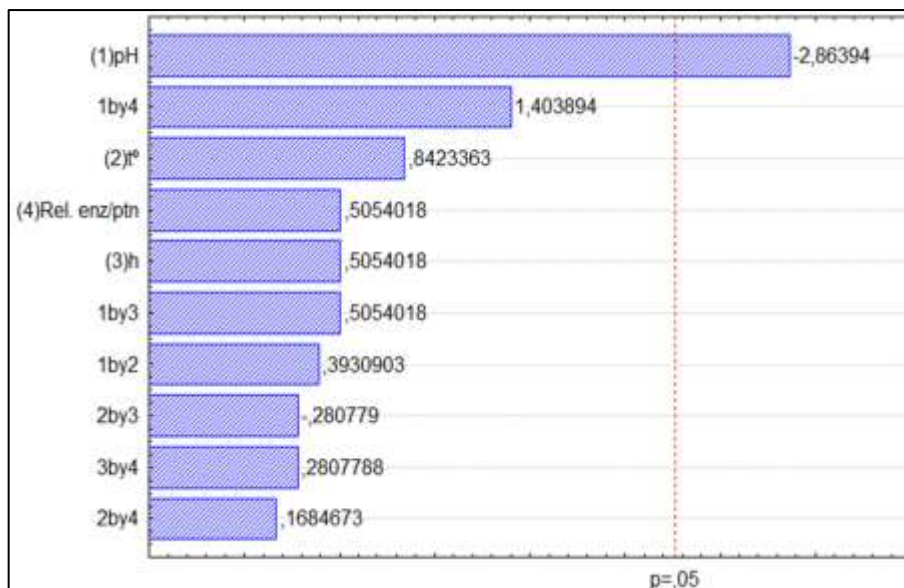


Figura 6 Diagrama de Pareto para análise das variáveis utilizadas no processo de hidrólise, pela atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes*

5.3 AVALIAÇÃO DO RENDIMENTO DA REAÇÃO DE HIDRÓLISE

Ao tratar de hidrólise enzimática, um importante parâmetro resultante que deve ser avaliado é o rendimento da reação (ZHONG et al, 2007). No presente trabalho foram obtidos os resultados de rendimento de hidrólise são apresentados na Figura 7 (APÊNDICES C, D e E).

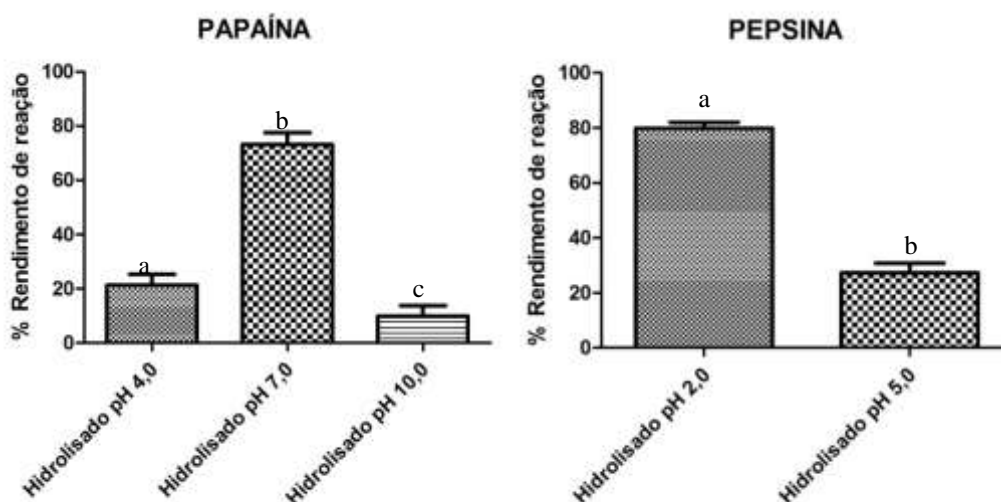


Figura 7 Comparação estatística do Rendimento da Reação de Hidrólise Enzimática do Extrato proteico da torta de soja. Letras diferentes representam resultados significativamente diferentes ($p < 0,05$)

Deve-se atentar que o maior rendimento de hidrólise, comparando aqueles realizados com papaína, ocorreu em pH 7,0 e, entre os realizados com pepsina, aquele em pH 2,0. Tais resultados encontram-se de acordo com o esperado, devido às características de cada enzima. A papaína, sendo uma cisteína-protease, apresenta atividade proteolítica em valores de pH de 5,0 a 9,0. A pepsina, por sua vez, como protease aspártica, apresenta maior atividade na faixa de pH de 1,0 a 4,0, sendo seu pH ótimo 1,8 (KOBBLITZ, 2008).

Vastag et al (2011) encontrou valores para grau de hidrólise de 53,23, 37,17 e 70% para hidrolises realizadas com Alcalase, Flavourzyme e utilizando as enzimas combinadas, respectivamente, a partir de isolado protéico de torta de abóbora. Foi encontrado também rendimento de hidrólise de 40% para hidrolisado proteico a partir de uma mistura de farinha de sementes oleaginosas (RADHA; KUMAR; PRAKASH, 2007).

5.4 AVALIAÇÃO DA MASSA MOLECULAR DE PROTEÍNAS E PEPTÍDEOS OBTIDOS

Foram preparados dois diferentes géis de corrida para eletroforese (SDS-PAGE e SDS-PAGE Tris-Tricina) a fim de avaliar as proteínas e peptídeos resultantes da hidrólise enzimática em um largo espectro de massa molecular.

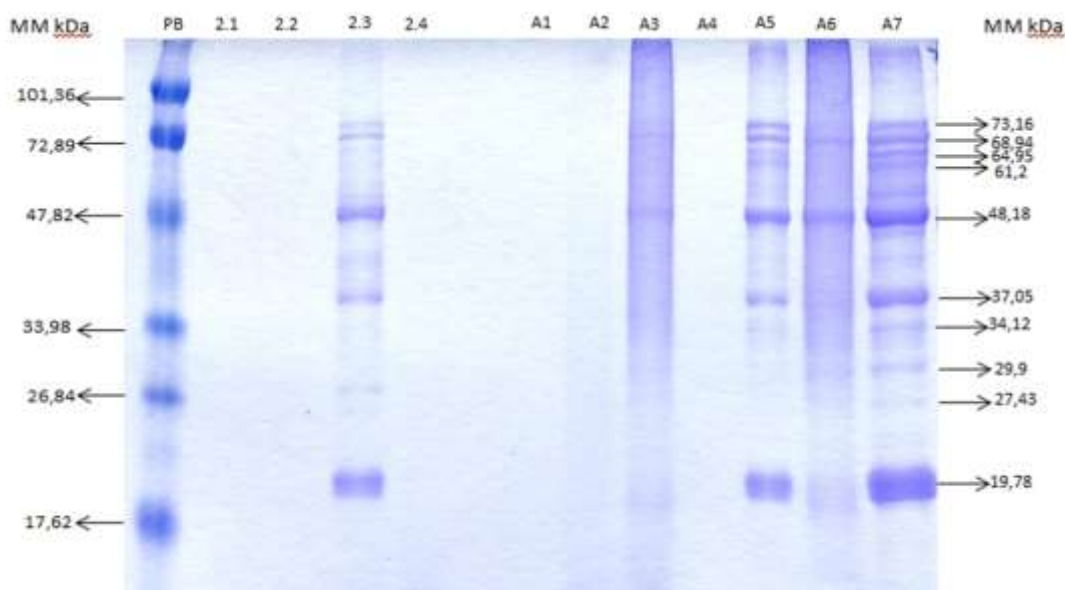


Figura 8 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) das amostras tratadas com pepsina (2.1, 2.2) e papaína (A1, A2 e A3)

PB – Padrão de baixa massa molecular; 2.1 – Hidrolisado em pH 2,0; 2.2 – Hidrolisado em pH 5,0; 2.3 – Branco em pH 2,0; 2.4 – Branco em pH 5,0; A1 – Hidrolisado em pH 4,0; A2 – Hidrolisado em pH 7,0; A3 – Hidrolisado em pH 10,0; A4 – Branco em pH 4,0; A5 – Branco em pH 7,0; A6 – Branco em pH 10,0; A7 – Extrato proteico da torta de soja.

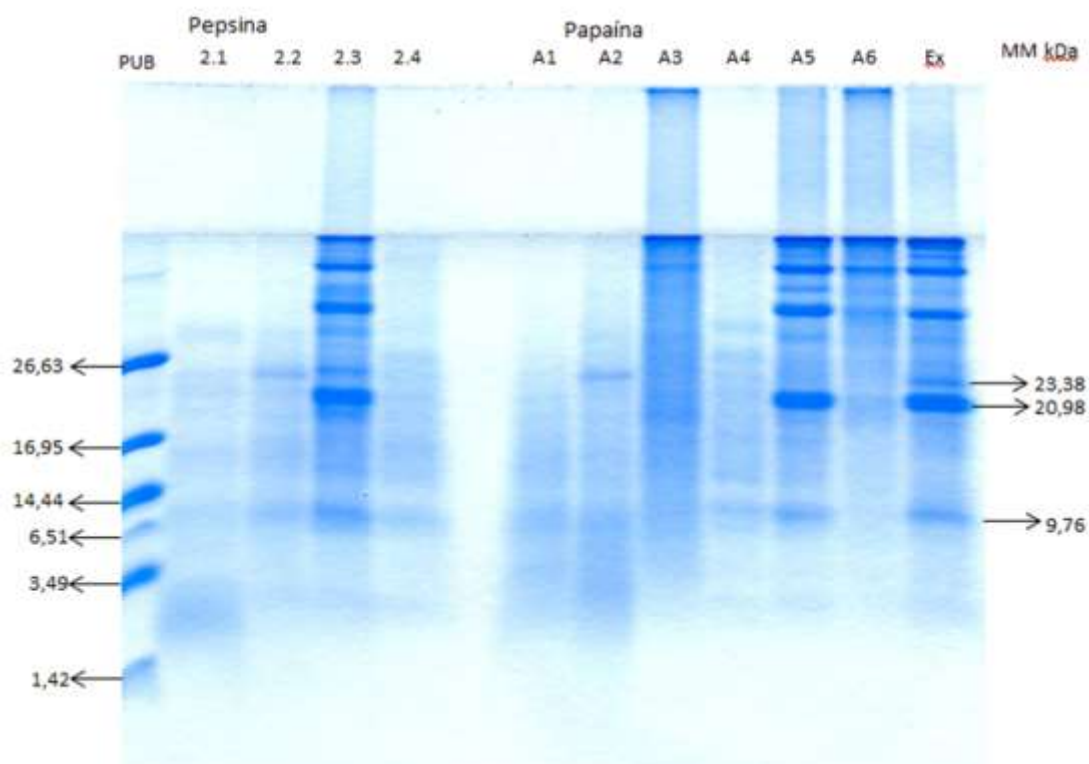


Figura 9 Eletroforese em gel SDS-PAGE Tris-Tricina (16,5%T, 3%C) com amostras tratadas com pepsina (2.1, 2.2) e papaína (A1, A2 e A3)

PUB – Padrão de ultra baixa massa molecular; 2.1 – Hidrolisado em pH 2,0; 2.2 – Hidrolisado em pH 5,0; 2.3 – Branco em pH 2,0; 2.4 – Branco em pH 5,0; A1 – Hidrolisado em pH 4,0; A2 – Hidrolisado em pH 7,0; A3 – Hidrolisado em pH 10,0; A4 – Branco em pH 4,0; A5 – Branco em pH 7,0; A6 – Branco em pH 10,0; EX – Extrato proteico da torta de soja.

Conforme pode ser observado na Figura 8, as amostras dos brancos para os valores de pH 2,0; 7,0 e 10,0 apresentam bandas proteicas semelhantes às encontradas na amostra de extrato de soja sem nenhum tipo de tratamento, de acordo com o esperado. No entanto, os brancos em pH 4,0 e 5,0 não apresentaram nenhuma banda proteica. Em pH em torno de 4,5 encontra-se o ponto isoelétrico das proteínas da soja (LIU, 1997). Os valores de pH 4,0 e 5,0 utilizados no ensaio são os mais próximos do ponto isoelétrico, fazendo com que este provoque a menor solubilidade e por isto, maior precipitação das proteínas (MARTINS; COSTA; PRENTICE-HERNÁNDEZ, 2009). Com a centrifugação realizada durante o processo houve a separação da proteína já precipitada (devido ao pH ácido) e o sobrenadante remanescente permaneceu isento de proteína, o que justifica a ausência de bandeamento nos tratamentos 2.4 e A4. Uma vez que não havia proteínas suficientes em solução para a hidrólise, as amostras hidrolisadas em valores de pH 4,0 e 5,0 também não apresentam bandas proteicas, o que está dentro do esperado. As amostras hidrolisadas com papaína em pH 7,0 e

com pepsina em pH 2,0 não apresentam bandejamento, indicando ocorrência de hidrólise e redução da massa molecular das proteínas presentes. O mesmo pode ser verificado nas amostras hidrolisadas em pH 10,0. No entanto, nesta amostra, a presença de bandas vestigiais indica uma menor eficiência de hidrólise, o que é confirmado pelos resultados de rendimento.

A Figura 9 mostra uma faixa de massa molecular inferior. As amostras em branco em todos os valores de pH apresentam bandejamento semelhante ao extrato sem tratamento, indicando que o extrato de soja naturalmente contém proteínas de baixa massa molecular e peptídeos, mantidos em solução, mesmo em pH ácido próximo do ponto isoeletrico das proteínas da soja, embora em menor concentração. No entanto, as amostras hidrolisadas tanto com papaína quanto com pepsina não apresentam bandejamento nítido, indicando baixa concentração ou ausência de peptídeos e proteínas nessa faixa de massa molecular. A baixa concentração de peptídeos nessa faixa, por serem amostras de misturas de peptídeos e não de peptídeos isolados, pode ter dificultado a identificação dos mesmos utilizando o reagente de cor (coomassie blue R250). Além disso, os resultados indicam que a hidrólise pode ter sido total ou houve formação de peptídeos bem menores, impossíveis de serem detectados pelo método.

A papaína e a pepsina são proteases de baixa especificidade, capazes de provocar hidrólise extensiva em proteínas provenientes de diferentes fontes. Sendo assim, a formação de peptídeos de massa molecular abaixo de 1 kDa ou a ocorrência de hidrólise total do substrato, com liberação de resíduos de aminoácidos, está de acordo com o comportamento esperado para as enzimas usadas nas reações de hidrólise, especialmente no seu pH ótimo (7,0 para papaína e 2,0 para pepsina) (KOBBLITZ, 2008). A presença de compostos com atividade antimicrobiana com massa molecular abaixo de 1 kDa foi relatada por Nascimento (2003), que ao avaliar a atividade antibacteriana de diferentes *pools* contendo peptídeos de semente de soja contra as bactérias *Ralstonia solanacearum* (Gram-negativa) e *Clavibacter michiganensis* (Gram-positiva) identificou, através da análise em espectrômetro de massa, a presença de compostos de massas moleculares 678,61 Da; 700,60 Da e menores do que 500 Da.

5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Ao analisar a atividade antimicrobiana no teste preliminar, verificou-se uma diferença significativa entre os halos de *L. monocytogenes* e *S. Enteritidis* para um mesmo hidrolisado aplicado. Sabendo das características inerentes a cada uma destas bactérias (*L. monocytogenes*

Gram-positiva e *S. Enteritidis* Gram-negativa) optou-se por avaliar a atividade antimicrobiana dos hidrolisados obtidos em procedimento otimizado, contra outras bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*), e Gram-negativas (*Salmonella Brasil* e *Escherichia coli*).

Considerando os processos otimizados de extração e hidrólise enzimática, na discussão de atividade antimicrobiana será dada ênfase aos hidrolisados obtidos em pH 7,0 para papaína e em pH 2,0 para pepsina.

5.5.1 Resultados da Atividade Antimicrobiana de Hidrolisados obtidos com uso de Papaína

Na Figura 10 (A, B e C) são apresentadas as fotos dos halos de inibição das bactérias Gram-positivas e na Figura 11 (A, B e C) das Gram-negativas, resultantes dos tratamentos com papaína em pH 7,0.

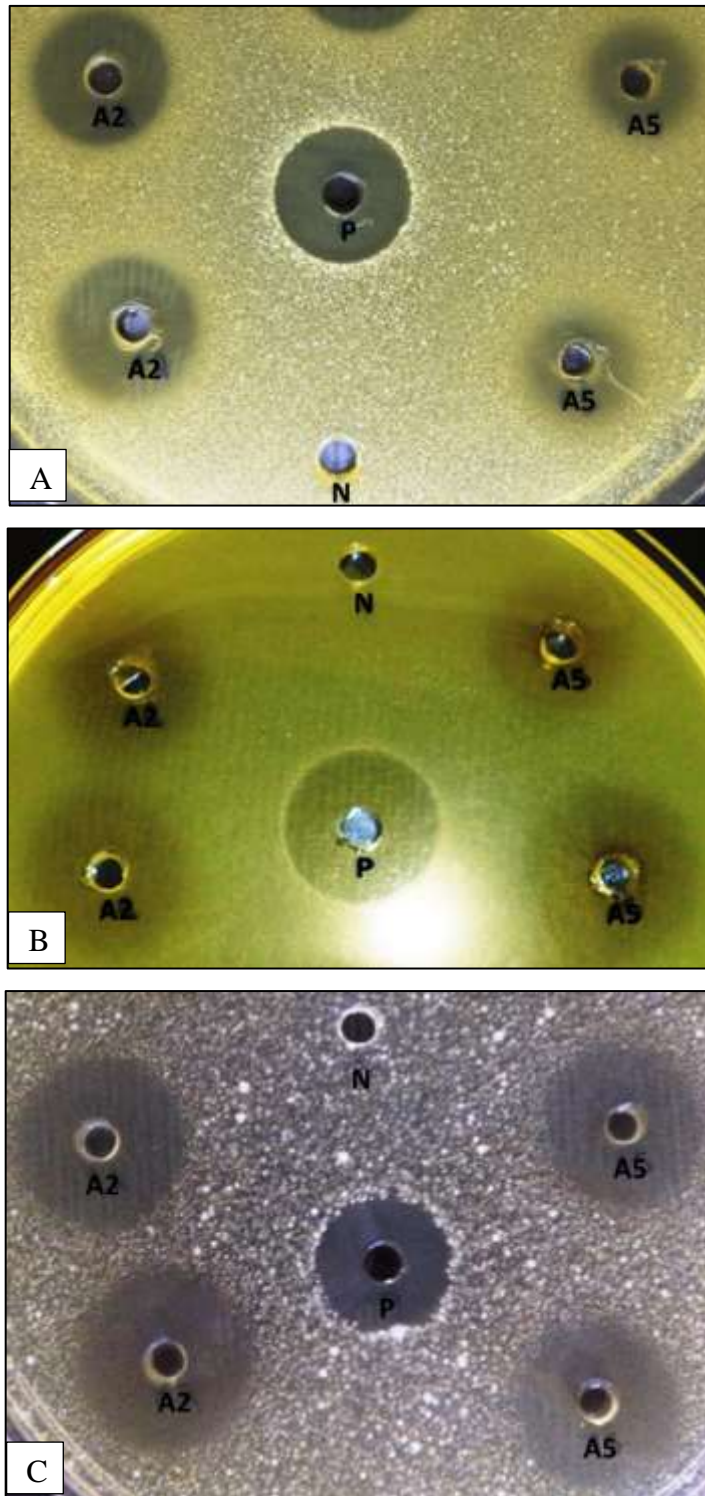


Figura 10 Halos de inibição: bactérias Gram-positivas pelo Método de difusão em poços de ágar (PAPAÍNA)

A- Teste realizado com *S. aureus*; Figura B- *L. monocytogenes*; Figura C- *B. cereus*. Legenda comum a A, B e C: A2- Hidrolisados em pH 7,0; A5- Branco em pH 7,0; P- Controle positivo; N- Controle negativo.

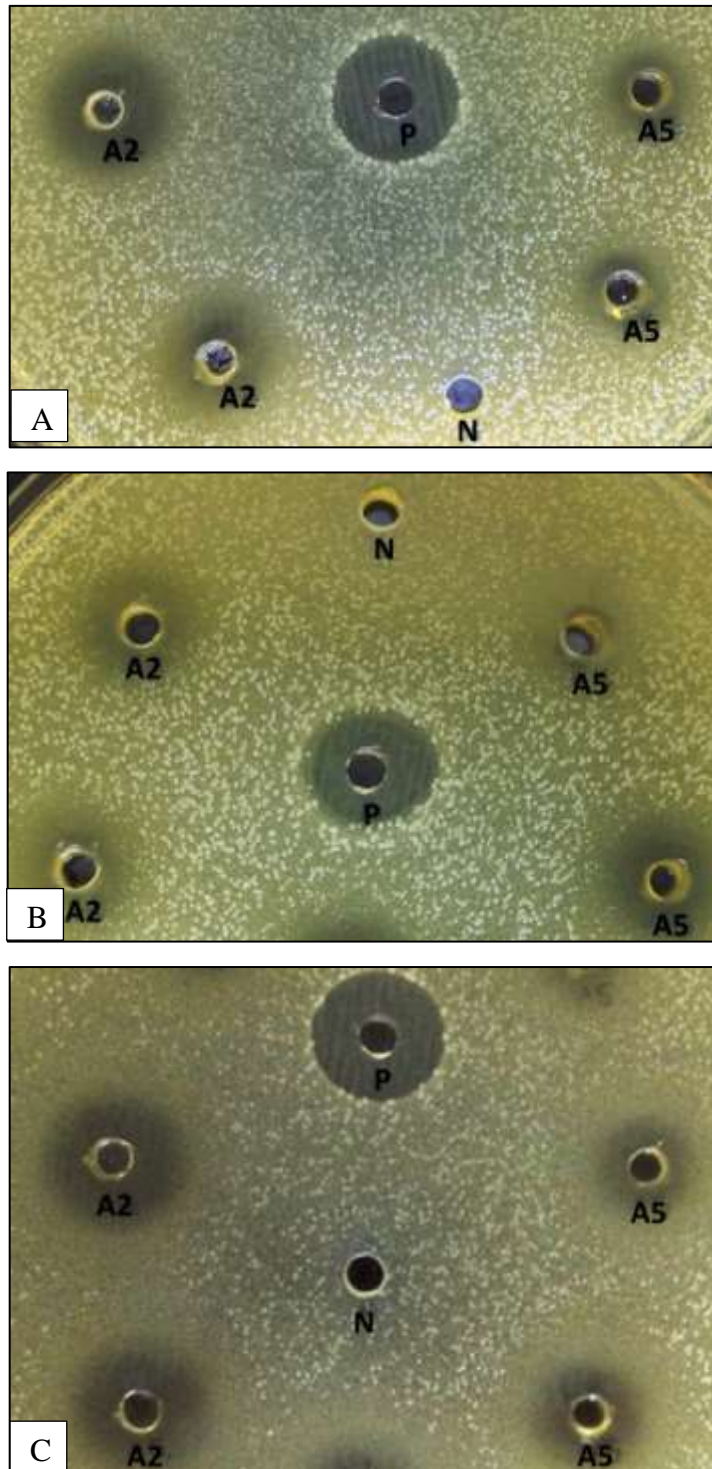


Figura 11 Halos de inibição: bactérias Gram-negativas pelo Método de difusão em poços de ágar (PAPAÍNA)
A- Teste realizado com *S. Enteritidis*; Figura B- *S. Brasil*; Figura C- *E. coli*. Legenda comum a A, B e C: A2- Hidrolisados em pH 7,0; A5- Branco em pH 7,0; P- Controle positivo; N- Controle negativo.

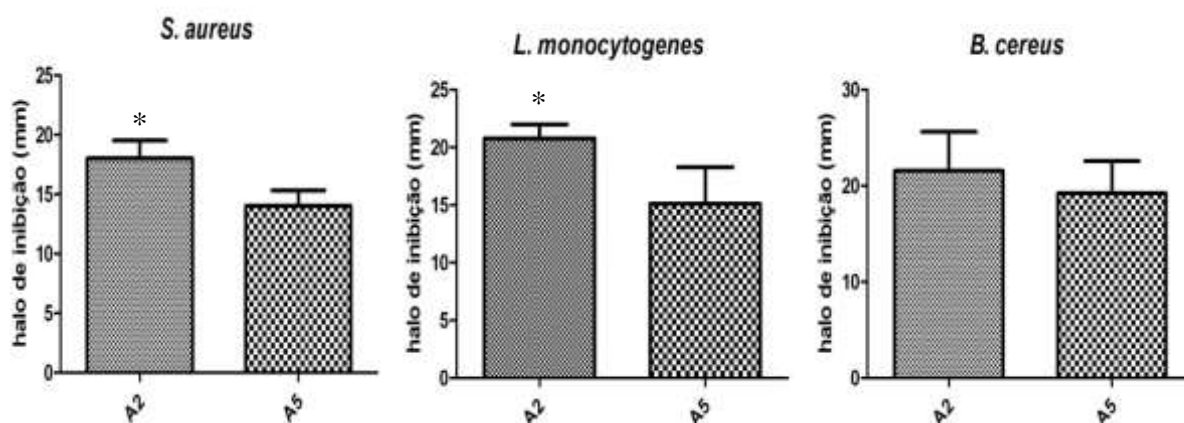


Figura 12 Comparação estatística de atividade antimicrobiana contra Bactérias Gram-positivas, entre Hidrolisado e Branco em pH 7,0 (PAPAÍNA)

* significativamente diferentes ($p < 0,05$)

A2- Hidrolisado proteico em pH 7,0; A5- Branco em pH 7,0.

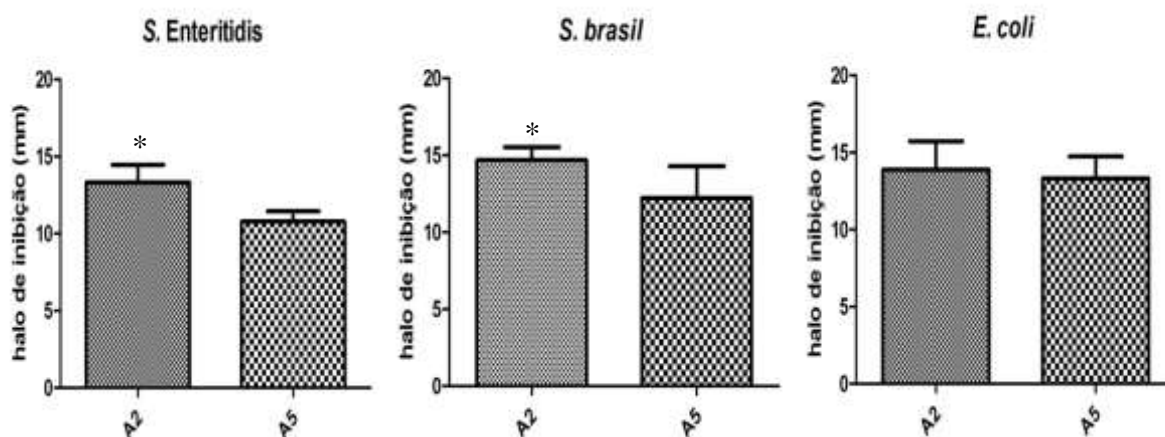


Figura 13 Comparação estatística de atividade antimicrobiana contra Bactérias Gram-negativas, entre Hidrolisado e Branco em pH 7,0 (PAPAÍNA)

* significativamente diferentes ($p < 0,05$)

A2- Hidrolisado proteico em pH 7,0; A5- Branco em pH 7,0.

A partir da mensuração dos halos de inibição em milímetros (APÊNDICES F e G), foi possível analisar estatisticamente os resultados de atividade antimicrobiana, que demonstram que os hidrolisados obtidos em pH 7,0 possuem maior atividade antimicrobiana do que o branco tratado em mesmo pH para *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. Enteritidis* e *S. Brasil*. (Figuras 12 e 13). Tal resultado pode ser explicado por este ser o pH ótimo da papaína (KOBBLITZ, 2008), se considerarmos que o aumento da atividade antimicrobiana ocorreu pela presença de compostos resultantes da hidrólise enzimática. Porém tais afirmações devem ser

estudadas mais profundamente, a fim de identificar quais foram as substâncias responsáveis pela atividade antimicrobiana, não tendo sido este o objetivo no presente trabalho.

Observando os gráficos (Figuras 12 e 13) percebeu-se ainda que, embora não estatisticamente significativa, parece haver diferença entre a atividade antimicrobiana dos hidrolisados obtidos em pH 7,0 e seus respectivos brancos para os demais microrganismos (*B. cereus* e *E. coli*). O fato destes resultados não serem diferentes estatisticamente, pode estar associado ao desvio padrão elevado, o que os torna semelhantes. Tal desvio pode ser justificado por estarmos tratando de um método qualitativo, onde o objetivo era verificar se havia ou não atividade antimicrobiana. Acredita-se que novas repetições dos ensaios poderiam indicar diferença significativa.

A atividade antimicrobiana constatada nos “brancos”, ou seja, aquelas amostras de extrato de soja submetidas ao mesmo processamento térmico, durante o mesmo tempo que os hidrolisados, porém sem adição de enzima, pode ser explicada devido à presença de compostos orgânicos, inerentes à soja, que possuem tal atividade como, por exemplo, as saponinas, fitoalexinas, gliccolina descritas anteriormente (AHUJA, 2012; ALBERICE, 2012; CLEVELAND, 2010; NWACHUKWU, 2013; SIMÕES, 2005).

Os hidrolisados obtidos em pH 7,0 apresentaram os maiores halos de inibição, com valores entre 20 e 25mm, para *S. aureus* e *B. cereus*, e entre 15 e 16mm para *S. Brasil* e *E. coli* respectivamente. Valores semelhantes foram encontrados para óleos de orégano e cravo que apresentaram uma zona de inibição de 18,9 mm e 14,9 mm, respectivamente, sobre cepas de *S. aureus* e 29,5mm e 11,7mm sobre as cepas de *E. coli* (SANTOS et al, 2011).

A fim de avaliar melhor a diferença entre os hidrolisados em pH 7,0 e o branco, foi realizado o teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) (Tabela 9).

Tabela 9 Concentração inibitória mínima de Hidrolisado em pH 7,0 por papaína contra *S. aureus*

Repetições	Hidrolisado em pH 7,0	Branco em pH 7,0
1	3,7363	3,9798
2	3,7427	3,9865
3	3,7800	3,9762
Média	3,753 ± 0,02*	3,981 ± 0,01

*Diferente estatisticamente de forma significativa pelo teste de t (p<0,005)

Como resultado, foi obtida a média de CIM de 3,753 mg/mL, a partir da matéria seca, liofilizada. Os valores obtidos neste método demonstram que estes diferem estatisticamente ($p < 0,005$), corroborando com os resultados obtidos pelo método de difusão em poços de ágar.

Dados na literatura demonstram a CIM utilizando diferentes unidades de grandeza, variando de $\mu\text{g/mL}$ a mg/mL , como por exemplo a CIM do antibiótico comercial tetraciclina $1,31\mu\text{g/mL}$ e a CIM do extrato de romã (*P. granatum*) de 25 mg/mL (LEE, 2006; MICHELIN, 2005). Tendo em vista a avaliação da CIM de uma amostra de hidrolisado proteico contendo uma diversidade de compostos ao invés de um composto isolado que apresenta atividade antimicrobiana, era esperado que fossem obtidos resultados em mg/mL . Foi considerada a quantidade total de proteínas presente na amostra liofilizada do hidrolisado e do branco.

Os resultados da CIM demonstram que a hidrólise provocou a redução da CIM, indicando que uma menor concentração do produto hidrolisado em pH 7,0 com papaína é capaz de inibir o crescimento de *S. aureus* em comparação com o branco em mesmo pH. Tal fato indica que houve o aumento da eficiência de inibição do crescimento bacteriano após o tratamento enzimático.

5.5.2 Resultados da Atividade Antimicrobiana de Hidrolisados obtidos com uso de Pepsina

Na Figura 14 (A, B, C) são apresentadas as fotos dos halos de inibição das bactérias Gram-positivas e na Figura 15 (A, B e C) das Gram-negativas, resultantes dos tratamentos com pepsina em pH 2,0.

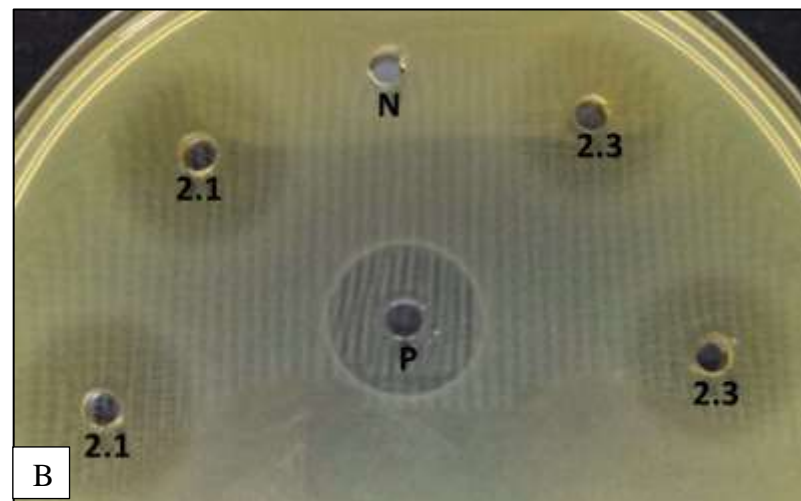
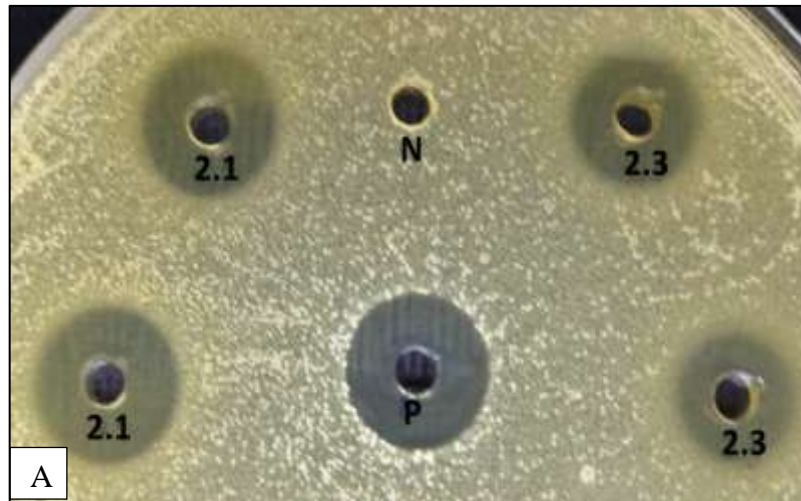


Figura 14 Halos de inibição: bactérias Gram-positivas pelo Método de difusão em poços de ágar (PEPSINA)

A- Teste realizado com *S. aureus*; Figura B- *L. monocytogenes*; Figura C- *B. cereus*. Legenda comum a A, B e C: 2.1- Hidrolisados em pH 2,0; 2.3- Branco em pH 2,0; P- Controle positivo; N- Controle negativo.

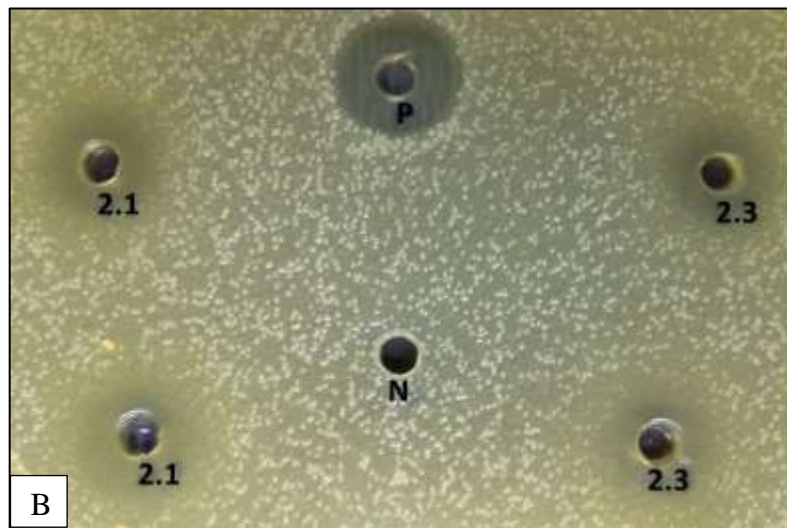
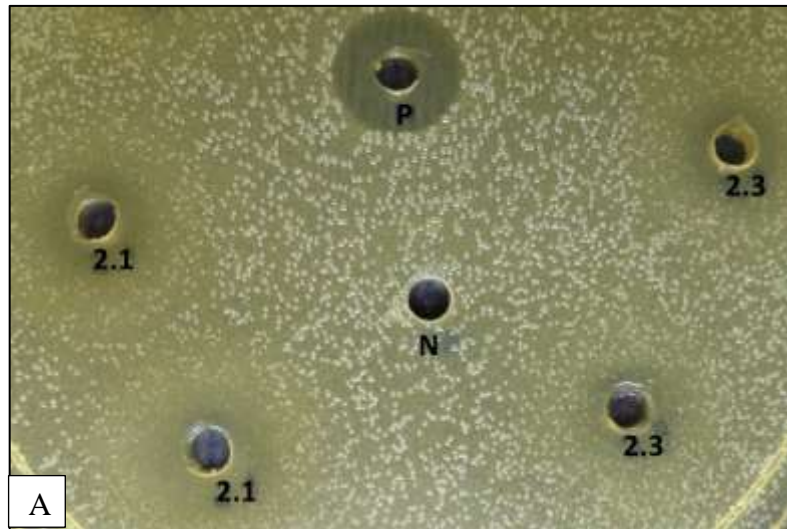


Figura 15 Halos de inibição: bactérias Gram-negativa pelo Método de difusão em poços de ágar (PEPSINA)

A- Teste realizado com *S. Enteritidis*; Figura B- *S. Brasil*; Figura C- *E. coli*. Legenda comum a A, B e C: 2.1- Hidrolisados em pH 2,0; 2.2- Branco em pH 2,0; P- Controle positivo; N- Controle negativo.

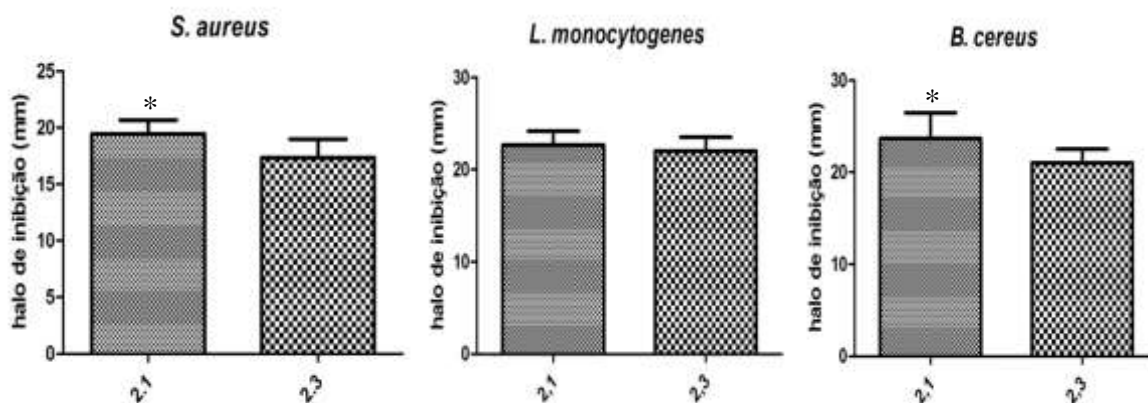


Figura 16 Comparação estatística de atividade antimicrobiana contra Bactérias Gram-positivas, entre Hidrolisado e Branco em pH 2,0 (PEPSINA)

* significativamente diferentes ($p < 0,05$)

2.1- Hidrolisado proteico em pH 2,0; 2.3- Branco em pH 2,0.

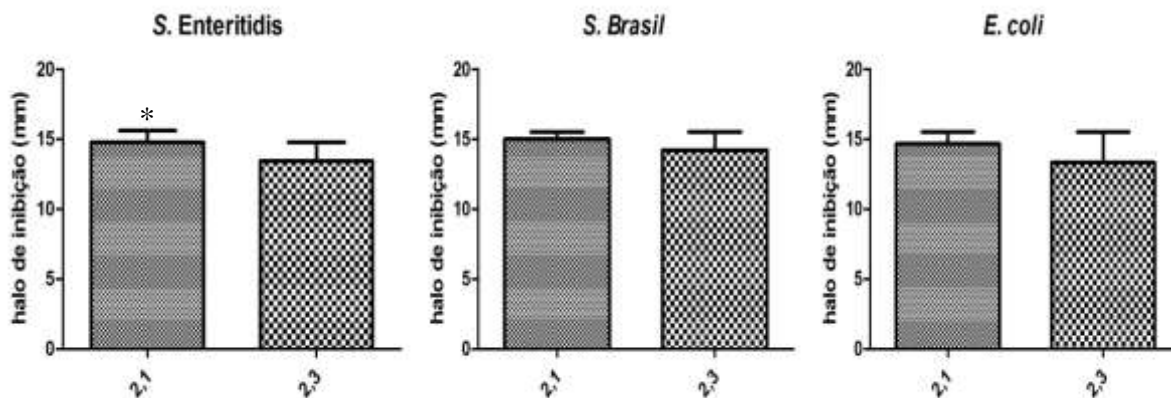


Figura 17 Comparação estatística de atividade antimicrobiana contra Bactérias Gram-negativas, entre Hidrolisado e Branco em pH 2,0 (PEPSINA)

* significativamente diferentes ($p < 0,05$)

2.1- Hidrolisado proteico em pH 2,0; 2.3- Branco em pH 2,0.

A partir da mensuração dos halos de inibição em milímetros (APÊNDICES H e I), foi possível analisar estatisticamente os resultados de atividade antimicrobiana, que demonstram que os hidrolisados obtidos em pH 2,0 (pH ótimo de atividade da pepsina) possuem maior atividade antimicrobiana do que o branco tratado em mesmo pH para *S. aureus*, *B. cereus* e *S.*

Enteritidis (Figuras 16 e 17). A inobservância de diferença significativa estatisticamente entre os testes realizados com *S. Brasil* e *E. coli* pode ser justificada por se tratar de microrganismos Gram-negativos, ou seja, menos susceptíveis a atividade antimicrobiana das amostras aplicadas, que conseqüentemente resultaram em menores halos, dificultando a mensuração e a comparação entre eles. Deve-se salientar que o método em questão é qualitativo, e a mensuração dos halos foi realizada para possibilitar a comparação entre o hidrolisado e o branco.

Assim, como discutido anteriormente nos resultados para hidrolisados do extrato proteico de torta de soja obtidos com papaína, o pH ótimo de atividade da pepsina (KOBBLITZ, 2008) demonstra ter relação direta com a atividade antimicrobiana destes hidrolisados. Acredita-se, portanto, que compostos resultantes da hidrólise enzimática influenciem no aumento da atividade antimicrobiana.

Foi possível confirmar que as bactérias Gram-positivas são mais sensíveis aos produtos obtidos da hidrólise da torta de soja (tanto com papaína quanto com pepsina) do que as Gram-negativas. Diversos pesquisadores relataram resultados semelhantes na literatura.

Fett e Osman (1982) mostraram que os flavonóides coumestrol e gliceolina presentes na soja possuem capacidade inibitória para várias cepas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, sendo as Gram-positivas geralmente mais sensíveis. Bactérias Gram-positivas são mais susceptíveis à nisina, que é uma bacteriocina comercial (ESWARANANDAM; HETTIARACHCHY; JOHNSON, 2004). Peptídeos purificados de diferentes plantas da família Rubiaceae (café e outras plantas tropicais) são ativos contra bactérias Gram-positivas (TAM et al, 1999). As investigações realizadas na área de engenharia genética levaram à descoberta de derivados de nisina com atividade aumentada contra os agentes patogênicos Gram-positivos, incluindo *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* (GÁLVEZ et al, 2010). Além de outras substâncias presentes nos alimentos relacionadas com atividade antimicrobiana mais efetiva contra bactérias Gram-positivas (DAVIDSON, 2005; SALEEM, 2010).

O fato de os maiores halos serem observados contra bactérias Gram positivas, pode estar relacionado com a composição de sua parede celular. Acredita-se que a maior parte dos compostos com atividade antimicrobiana nas amostras, especialmente saponinas e peptídeos naturais da soja, tenham ação sobre a membrana celular (NASCIMENTO, D., 2003) e que a penetração desses compostos através da parede é facilitada em bactérias Gram-positivas, que

não possuem recobrimento glicoproteico do peptídeoglicano, como acontece com as bactérias Gram-negativas (SALAZAR; ANSEJO, 2007).

6 CONCLUSÃO

As proteínas hidrossolúveis da torta de soja foram extraídas, de forma eficiente, aplicando as seguintes condições: 5 g de torta para 100 mL de solução tampão pH 9,0 sem adição de NaCl, rendendo 11,33 g/100 g de torta de soja.

Sendo o valor do pH a única variável que interfere de forma significativa ($p < 0,05$) na atividade antimicrobiana dos hidrolisados avaliados tanto contra *L. monocytogenes* quanto *S. Enteritidis*, foi possível estabelecer a metodologia de obtenção de hidrolisados proteicos da torta de soja utilizando a proporção de 1mg de enzima para 66,66 mg de proteínas, com temperatura de 50°C e por um menor tempo de reação (1h) .

O maior rendimento de hidrólise tanto para aquelas realizadas com papaína quanto com pepsina, ocorreu nos valores de pH ótimo de atividade das enzimas proteolíticas, confirmando ser o valor de pH o fator de maior influência na obtenção dos hidrolisados proteicos da torta de soja e conseqüentemente na sua atividade antimicrobiana.

Houve hidrólise do extrato proteico da torta de soja, porém a observação dos géis de eletroforese indica que a hidrólise possa ter sido total ou houve formação de peptídeos de menores e em baixas concentrações, não sendo detectados pelo método.

Os hidrolisados proteicos da torta de soja obtidos através da hidrólise enzimática realizada tanto com papaína quanto com pepsina, apresentaram atividade antimicrobiana contra *S. Enteritidis*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *B. cereus*, *S. Brasil* e *E. coli*. Sendo as bactérias Gram-positivas (*S. aureus*, *L. monocytogenes* e *B. cereus*) mais susceptíveis à ação dos compostos presentes nestes hidrolisados.

Após a hidrólise enzimática realizada com papaína, em pH 7,0, houve uma redução da CIM em comparação com o branco, indicando que a partir de um valor médio de CIM de 3,753 mg/mL, o hidrolisado proteico da torta de soja foi capaz de inibir o crescimento de *S. aureus*.

7 PERSPECTIVAS

A partir dos resultados obtidos no presente estudo, deve-se dar continuidade aos ensaios a fim de identificar e compreender os mecanismos de ação dos compostos responsáveis por esta atividade antimicrobiana, visando à futura aplicação dos hidrolisados da torta de soja como compostos biologicamente ativos para o controle das doenças de origem alimentar em humanos.

REFERÊNCIAS

- AGYEI, D.; APOSTOLOPOULOS, V.; DANQUAH, M. **Rethinking Food-derived Bioactive Peptides for Antimicrobial and Immunomodulatory activities.** Trends in Food Science & Technology, Elsevier. 2011.
- AHUJA, I.; KISSEN, R.; BONES, A. M. **Phytoalexins in defense against pathogens.** Trends in plant science, v. 17, n. 2, p. 73-90, 2012.
- ALBERICE, J. V.; HUACCA, M. E. F.; GUTERRES, S. B.; CARRILHO, E. **Inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in orange juice by Saponin extracts combined with heat-treatment.** International Journal of Food Microbiology, 2012.
- ALMEIDA, M. S.; CABRAL, K. M. S.; ZINGALI, R. B.; KURTENBACH, E. **Characterization of Two novel defense peptides from pea (*Pisum sativum*) seeds.** Archives of Biochemistry and Biophysics, 378 (2)278-286. 2000.
- BATISTA, C.; ROSENDO DA SILVA, L.; SEBEN, A.; SCALONI, A.; FERRARA, L.; PAIVA, G.; OLAMENDI-PORTUGAL, T.; POSSANI, L.; BLOCH, C.. **Antimicrobial peptides from the Brazilian frog - *Phyllomedusa distincta* sup.** Peptides, Elsevier, 20, 679-686. 1999.
- BELITZ, H.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. **Food chemistry** 4th revised and extended Edition. Berlin: Springer. 2009.
- BIZIULEVIČIUS, G.; KISLUKHINA, O.; KAZLAUSKAITE, J.; ŽUKAITE, V. **Food-protein enzymatic hydrolysates possess both antimicrobial and immunostimulatory activities: a 'cause and effect' theory of bifunctionality.** Immunology & Medical Microbiology, Wiley Online Library, 46, 131-138. 2006.
- BOIA, N.; KOBLITZ, M.G.B. **Optimization of protein extraction from soybean cake.** In: 16th World Congress of Food Science and Technology - IUFoST, 2012. v. 1. p. 10580-10580, Foz do Iguaçu, 2012.
- BOLLING, B.; BLUMBERG, J.; CHEN, C. **Extraction methods determine the antioxidant capacity and induction of quinone reductase by soy products in vitro** Food chemistry, Elsevier. 116: 351-355. 2009.
- BONATO, C. M. **Homeopathy in vegetal models.** International Journal of High Dilution Research, v. 6, n. 21, p. 24-28, 2007.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Portaria nº 540 – SVS/MS de 27 de outubro de 1997.** Aprova o Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares - definições, classificação e emprego. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/d1b6da0047457b4d880fdc3fbc4c6735/PORTARIA_540_1997.pdf?MOD=AJPERES> Acesso em: 22 ago. 2013. Resolução de 27 de out. de 1997.

BRASIL a. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Documento: Alegações de propriedade funcional aprovadas.**

<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/busca!/ut/p/c5/rZDNdqJAEIWfxQeIXd1AA0v-GxERaAKy4SDHEHQQjSLK0w_OrGM2qVrVqVP13XtRjqY-lremLq9Ndyz_oAzltPBC5joARA24YoIr8oipnhHYGKMUZSAW8f5xcsfDGO3H8M7HfM2_wsE37VU8-sD35d23pOU1GUafa8MleZCV6T5AUfG7HVqavt_xNplNrA0t4JvS4KnEcDQmystpproBriO tqBQG4Czg__U3ewjIDz5eXT-__5RC_kLdP_pz_8LbBuVy8e4QhXkOnoiyDq7FmR2ALYQEEP_FnF-zyK-yFihvtu18qNo5zFVBJApWZEGiWKRUROmiutzNzh9My4zOilnb2bXdvI3pZXdIrWtUxv3D TS0irjeffTHAB9ueb2ne6rV9-rKoKhms747SHFdnXsr_qSKUCZm3HTEKB157KmY9hHDVbFmiXAUzTedda6ubpfNh49 LPwOnqngG6THXZjO0Y127Q6f25nlLGk1CsSLUs7-E2KFG/?1dmy&urile=wcm%3apath%3a//Anvisa%20Portal/Anvisa/Inicio/Alimentos/Publicacao%20Alimentos/Alegacoes%20de%20propriedade%20funcional%20aprovadas> Acesso em: 15 out. 2013.

BRASIL b. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Regulamentação de aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia no Brasil.**

Disponível em:

<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/home/alimentos!/ut/p/c4/04_SB8K8xLLM9MSSzPy8xBz9CP0os3hnd0cPE3MfAwMDMydnA093Uz8z00B_A3cvA_2CbEdFADQgSKI!/?1dmy&urile=wcm%3Apath%3A/anvisa+portal/anvisa/inicio/alimentos/publicacao+alimentos/regulamentacao+de+aditivos+alimentares+e+coadjuvantes+de+tecnologia+no+brasil> Acesso em 21 ago 2013.

BRASIL c. Ministério da Saúde. Portal da Saúde. **Doenças transmitidas por alimentos - Informações gerais sobre a doença.** Disponível em:

<http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31757> Acesso em: 22 ago. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portal da Saúde. **Doenças transmitidas por alimentos - Descrição da doença.** Disponível em:

<http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31756> Acesso em: 29 out. 2012.

BRUL, S.; COOTE, P. **Preservative agents in foods: mode of action and microbial resistance mechanisms.** International Journal of Food Microbiology, v. 50, n. 1, p. 1-17, 1999.

BURDEN, R.J.; BAILEY, J A. **Structure of the phytoalexin from soybean.** Phytochemistry, 14: 1389-1390, 1975.

CABRAL, L. da C.; PINTO, V. F.; PATRIARCA, A. **Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods.** International Journal of Food Microbiology, 2013.

CHOI, J.; SABIKHI, L.; HASSAN, A.; ANAND, S. **Bioactive peptides in dairy products International.** Journal of Dairy Technology, Wiley Online Library. 2011.

CLEVELAND, T.; BOUE, S. BUROW, M.; WANG, T. **Glyceollins suppress androgen-responsive prostate cancer**. WIPO Patent n. 2010075418, 2 Geneva, Switzerland: World Intellectual Property Organization. Jul. 2010.

CODEX Alimentarius. **Codex General Standard For Food Additives**. CODEX Stan 192-1995, p. 1 - 332. Disponível em: <http://www.codexalimentarius.net/gsfonline/docs/CXS_192e.pdf> Acesso em: 22 ago. 2013.

CONTRERAS M.M.; HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; AMIGO, L.; MARTÍN-ÁLVAREZ, P.J.; RECIO, I. **Production of antioxidant hydrolyzates from a whey protein concentrate with thermolysin: Optimization by response surface methodology**. LWT - Food Science and Technology 44: 9-15. 2011.

CUNHA, M. A. A.; ANDRADE, A. C. W.; FERMIANI, E. A.; APPELT, P.; BURATTO, A. P. **Barras alimentícias formuladas com resíduo de soja**. Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos, Campo Mourão – PR, 1.2: 89-96. 2010.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4ª edição. Porto Alegre: Artemed, 2010.

DAVIDSON, P.M.; SOFOS, J. N.; BRANEN, A. L. **Antimicrobials in food**. Food Science and technology 3rd ed. Taylor & Francis Group. 2005.

ERICKSON, D. R. **Practical handbook of soybean processing and utilization**. AOCS press, 1995.

ESWARANANDAM, S.; HETTIARACHCHY, N.; JOHNSON, M. **Antimicrobial Activity of Citric, Lactic, Malic, or Tartaric Acids and Nisin-incorporated Soy Protein Film Against *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157: H7, and *Salmonella gaminara***. Journal of food science, Wiley Online Library, FMS79-FMS84. 2004.

FARBER, J. M.; PETERKIN, P. I. ***Listeria monocytogenes*, a Food-Borne Pathogen**. Microbiological Reviews, p. 476-511. Setembro. 1991

FETT, W. F.; OSMAN, S.F. **Inhibition of Bacteria by the Soybean Isoflavonoids Glyceollin and Coumestrol**. Phytopathology 72: 755-760. 1982.

FRANCO, B. D. G. M. de; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, 2008

FRANCO, O. **Peptide promiscuity: An evolutionary concept for plant defense**. FEBS letters, Elsevier. 2011.

GÁLVEZ, A.; ABRIQUEL, H.; BENOMAR, N.; LUCAS, R. **Microbial antagonists to food-borne pathogens and biocontrol**. Current opinion in biotechnology, Elsevier, 21, 142-148. 2010.

GOBBETTI, M.; MINERVINI, F.; RIZZELLO, C. **Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antimicrobial bioactive peptides**. International Journal of Dairy technology, Wiley Online Library, 57, 173-188. 2004.

GUERRERO, P.; STEFANI, P. M.; RUSECKAITE, R. A.; CABA de la, K. **Functional properties of films based on soy protein isolate and gelatina processed by compression molding**. Journal of Food Engineering. 105:65-72. 2011.

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

KAO, T.; CHEN, B. **Functional components in soybean cake and their effects on antioxidant activity**. Journal of agricultural and food chemistry, ACS Publications. 54: 7544-7555. 2006.

KAPEL, R.; RAHOU, E.; LECOUTURIER, D.; GUILLOCHON, D.; DHULSTER, P. **Characterization of an antihypertensive peptide from an Alfalfa white protein hydrolysate produced by a continuous enzymatic membrane reactor**. Process Biochemistry, Elsevier, 41, 1961-1966. 2006.

KIM, S.; PARK, P.; RHEE, K. **Functional properties of proteolytic enzyme modified soy protein isolate**. Journal of agricultural and food chemistry, ACS Publications, 38, 651-656. 1990.

KIM, S.; WIJESEKARA, I. **Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review**. Journal of Functional Foods, Elsevier. 2: 1-9. 2010.

KOBLITZ, M. G. B. **Bioquímica de Alimentos: teoria e Aplicações Práticas**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 2008.

KOBLITZ, M.G.B. **Matérias-Primas Alimentícias. Composição e Controle de Qualidade**. Ed. Guanabara-Koogan. 2011.

KONG, X.; GUO, M.; HUA, Y.; CAO, D.; ZHANG, C. **Enzymatic preparation of immunomodulating hydrolysates from soy proteins**. Bioresource technology, Elsevier. 99: 8873-8879. 2008.

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

LAEMMLI, U.K. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4**. Nature. 33: 680-685. 1970.

LEE, M. H.; KWON, H.; KWON, D. Y.; PARK, H.; SOHN, D. H.; KIM, Y. C.; EO, S. K.; KANG, H. Y.; KIM, S. W.; LEE, J. H. **Antibacterial activity of medicinal herb extracts against *Salmonella***. International Journal of Food Microbiology, v. 111, n. 3, p. 270-275, 2006.

- LIEPKE, C.; BAXMANN, S.; HEINE, C.; BREITHAUPT, N.; STANDKER, L.; FORSSMANN, W. **Human hemoglobin-derived peptides exhibit antimicrobial activity: a class of host defense peptides.** Journal of Chromatography B, Elsevier, 791, 345-356. 2003.
- LIU, K. **Soybeans: chemistry, technology, and utilization.** Soyfood Laboratory Hartz Seed, a Unit of Monsanto Company. Chapman & Hall. International Thompson Publishing. 1997.
- LOIR, Y. L.; BARON, F.; GAUTIER, M. **Staphylococcus aureus and food poisoning – Review.** Genetics and Molecular Research. 2 (1): 63-76. 2003.
- LÓPEZ-EXPÓSITO, I.; QUIRÓS, A.; AMIGO, L.; RECIO, I. **Casein hydrolysates as a source of antimicrobial, antioxidant and antihypertensive peptides.** Le Lait, 87, 241-249, 2007.
- LOWRY, O.H; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. **Protein measurement with the Folin-Phenol reagents.** Journal of Biological Chemistry. 193: 265-275. 1951.
- MARTIN, J. G. P.; PORTO, E.; CORRÊA, C. B.; DE ALENCAR, S. M.; DA GLORIA, E. M.; CABRAL, I. S. R.; DE AQUINO, L. M. **Antimicrobial potential and chemical composition of agro-industrial wastes.** Food and Nutrition Department, University of São Paulo, Piracicaba, Brasil. Journal of Natural Products, Vol. 5: 27-36. 2012.
- MARTINS, V. G.; COSTA, J. A. V.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. **Hidrolisado protéico de pescado obtido por vias química e enzimática a partir de Corvina (*Micropogonias furnieri*).** Química Nova, vol 32, 1: 61-66. 2009.
- MAZARO, S. M.; CITADIN, I.; GOUVÊA de, A.; LUCKMANN, D.; GUIMARÃES, S. S. **Indução de fitoalexinas em cotilédones de soja em resposta a derivados de folhas de pitangueira.** Ciência Rural, v. 38, n. 7, p. 1824-1829, 2008.
- MEJIA de, E.; LUMEN de, B. **Soybean bioactive peptides: A new horizon in preventing chronic diseases.** Sexuality, Reproduction and Menopause, Elsevier. 4: 91-95. 2006.
- MELO de, N. R.; SOARES, N. de F. F.; GONCALVES, M. P. J. **Nisina: Um Conservante Natural para Alimentos.** Revista Ceres, UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA. 52: 921. 2005.
- MESA, M.; SILVAN, J.; OLZA, J.; GIL, A.; DEL CASTILLO, M. **Antioxidant properties of soy protein-fructooligosaccharide glycation systems and its hydrolyzates.** Food research international, Elsevier. 41: 606-615. 2008.
- MICHELIN, D. C.; MORESCHI, P. E.; LIMA, A. C.; NASCIMENTO, G. G. F.; PAGANELLI, M. O.; CHAUD, M. V. **Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais.** Rev Bras Farmacogn, 15(4), 316-320. 2005.
- MILLS, S.; STANTON, C.; HILL, C.; ROSS, R. **New developments and applications of bacteriocins and peptides in foods.** Annual Review of Food Science and Technology, Annual Reviews, 2, 299-329. 2011.

MINE, Y.; MA, F.; LAURIAU, S. **Antimicrobial peptides released by enzymatic hydrolysis of hen egg white lysozyme.** Journal of agricultural and food chemistry, ACS Publications, 52, 1088-1094. 2004.

MOURE, A.; DOMINGUEZ, H.; PARAJO, J. **Antioxidant properties of ultrafiltration-recovered soy protein fractions from industrial effluents and their hydrolysates.** Process Biochemistry, Elsevier. 41: 447-456. 2006.

MURTHY, M. V. R.; PADMANABHAN, S.; RAMAKRISHNA, M.; LOSANE, B. K. **Comparison of nine different caseinolytic assays for estimation of proteinase activity and further improvement of the best method.** Fermentation Technology and Bioengineering Department, Central Food Technological Research Institute, Mysore, India. Food Biotechnology, 11(1), 1-23. 1997.

NASCIMENTO, Danielle Gomes. **Purificação, caracterização bioquímica e atividade antimicrobiana de peptídeos de semente de soja (*Glycine max* [L.] Merrill).** Orientadora: Maria Cristina Baracat Pereira. Conselheiros: Elizabeth Pacheco Batista Fontes e Reginaldo da Silva Romeiro. 2003. 101 f. Tese (“Magister Scientiae”) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2003.

NASCIMENTO, Maristela da Silva; MORENO, Izildinha; KUAYE, Arnaldi Yoshiteru. **Bacteriocinas em alimentos: uma revisão.** Brazilian Journal of Food Technology, v. 11, p. 120-127, 2008.

NEGI, P. S. **Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application.** International journal of food microbiology, v. 156, n. 1, p. 7-17, 2012.

NEVES, R. A. M.; MIRA, N. V. M de; MARQUEZ, U. M. L. **Caracterização de hidrolisados enzimáticos de pescado.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 24, n. 1, p. 101-108, 2004.

NEVES, V. A.; LOURENÇO, E. J.; SILVA da, M. A. **Extração, isolamento e fracionamento da proteína de tremço (*Lupinus albus*) var. Multolupa.** Alimentos e Nutrição, São Paulo, 12: 115-130. 2001.

NCCLS. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition.** NCCLS document M7-A6 [ISBN 1-56238-486-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

NCCLS. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement.** CLSI/NCCLS document M100-S15 [ISBN 1-56238-556-9]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA. Page 153. 2005.

NWACHUKWU, I. D.; LUCIANO, F. B.; UDENIGWE, C. C. **The inducible soybean glyceollin phytoalexins with multifunctional health-promoting properties.** Food Research International, 2013.

OLIVEIRA de, C. P.; SIQUEIRA JÚNIOR, J. P.; SILVA, J. A. **Bacteriocinas como alternativa na conservação de alimentos**. Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável, v. 7, n. 1, p. 09-15, 2012.

ORDÓÑEZ, J. A.; RODRIGUEZ, M.; ÀLVAREZ, L.; SANZ, M.; MINGUILLON, G.; PERALES, L.; CORTECERO, M. **Tecnología de alimentos: componentes dos alimentos e processos**. vol. 1. Porto Alegre: Artmed. 2005.

PEÑTA-RAMOS, E. A.; XIONG, Y. L. **Antioxidant activity of soy protein hydrolysates in a liposomal system**. Journal of food science, v. 67, n. 8, p. 2952-2956, 2002.

PEREZ ESPITIA, P. J.; SOARES, N. F. F.; COIMBRA, J. S. R.; ANDRADE, N. J.; CRUZ, R. S.; MEDEIROS, E. A. A. **Bioactive peptides: synthesis, properties, and applications in the packaging and preservation of food**. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, Wiley Online Library, 11, 187-204. 2012.

RADHA, C.; KUMAR, P. R.; PRAKASH, V. **Preparation and characterization of a protein hydrolysate from an oilseed flour mixture**. Food Chemistry, 106: 1166-1174. 2007.

RAMACHANDRAN, S.; SINGH, S. K.; LARROCHE, C.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. **Oil cakes and their biotechnological applications – A review**. Bioresource Technology 98: 2000-20009. 2007.

RILEY, M.; WERTZ, J. **Bacteriocins: evolution, ecology, and application**. Annual Reviews in Microbiology, Annual Reviews 4139 El Camino Way, PO Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA, 56, 117-137. 2002.

SALAMPESSEY, J.; PHILLIPS, M.; SENEWEERA, S.; KAILASAPATHY, K. **Release of antimicrobial peptides through bromelain hydrolysis of leatherjacket (Meuschenia sp.) insoluble proteins**. Food Chemistry, Elsevier. 120: 556-560. 2010.

SALAZAR, O.; ASENJO, J.A. **Enzymatic lysis of microbial cells**. Biotechnology Letters 29:985–994, 2007.

SALEEM, M.; NAZIR, M.; ALI, M. S.; HUSSAIN, H.; LEE, Y. S.; RIAZA, N.; JABBAR, A. **Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates – Review**. Natural Product Reports. 27, 238–254. 2010.

SANTOS, J. C.; FILHO, C. D. C.; BARROS, T. F.; GUIMARÃES, A. G. **Atividade antimicrobiana in vitro dos óleos essenciais de orégano, alho, cravo e limão sobre bactérias patogênicas isoladas de vôngole**. Semina: Ciências Agrárias, Londrina. 32, 4: 1557-1564. 2011.

SARMADI, B.; ISMAIL, A. **Antioxidative peptides from food proteins: A review**. Peptides, Elsevier. 31: 1949-1956. 2010.

SCALLAN, E.; HOEKSTRA, R. M.; ANGULO, F. J.; TAUXE, R.V.; WIDDOWSON, M. A.; ROY, S. L.; JONES, J. L.; GRIFFIN, P. M. **Foodborne Illness Acquired in the United States—Major Pathogens**. Emerging Infectious Diseases. <www.cdc.gov/eid> 17:1 January. 2011.

SCHÄGGER, H.; VON JAGOW, G. **Tricine-sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa.** Analytical Biochemistry. 166: 368-379. 1987.

SCHULZ, D.; PEREIRA, M.; BONELLI, R.; NUNES, M.; BATISTA, C. **Bacteriocinas: mecanismo de ação e uso na conservação de alimentos.** Alimentos e Nutrição Araraquara. 14. 2009.

SHAH, N. **Effects of milk-derived bioactives: an overview.** British Journal of Nutrition, Cambridge Univ Press, 84, 3, 2000.

SILVA JR, E. A. da. **Manual de Controle Higiénico-Sanitário em Serviços de Alimentação.** 6ª edição. Livraria Varela, São Paulo. 2008.

SILVA, M. S.; NAVES, M. M. V.; OLIVEIRA de, R. B.; LEITE, O. de S. M. **Composição química e valor protéico do resíduo de soja em relação ao grão de soja.** Ciência e Tecnologia de Alimentos. 26(3): 571-576. Campinas. jul.-set. 2006.

SIMÕES, C. M. de O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** Santa Catarina: Editora da UFSC, 2005.

SMACCHI, E.; GOBBETTI, M. **Bioactive peptides in dairy products: synthesis and interaction with proteolytic enzymes.** Food Microbiology, Elsevier, 17, 129-141. 2000.

TAM, J. P.; LU, Y. A.; YANG, J. L.; CHIU, K. W. **An unusual structural motif of antimicrobial peptides containing end-to-end macrocycle and cystine-knot disulfides.** Proceedings of the National Academy of Sciences, 99: 8913-8918. 1999.

THANH, V.H.; SHIBASAKI, K. **Major proteins of soybean seeds. A straightforward fractionation and their characterization.** Journal of Agricultural and Food Chemistry 24 (6), 1117-1121. 1976.

U.S.F.D.A. Food and Drug Administration. **Foodborne Illness-Causing Organisms in the U.S.** Disponível em:
<<http://www.fda.gov/downloads/Food/FoodborneIllnessContaminants/UCM187482>> Acesso em: 15 ago. 2013.

USDA a. United States Department of Agriculture. **Foreign Agricultural Service - Table 03: Major Vegetable Oils: World Supply and Distribution (Commodity View).** Disponível em:
<<http://www.fas.usda.gov/psdonline/psdreport.aspx?hidReportRetrievalName=BVS&hidReportRetrievalID=533&hidReportRetrievalTemplateID=5>> Acesso em: 12 ago. 2013

USDA b. United States Department of Agriculture. **Foreign Agricultural Service - Table 09: Soybean Oil: World Supply and Distribution.** Disponível em:
<<http://www.fas.usda.gov/psdonline/psdreport.aspx?hidReportRetrievalName=BVS&hidReportRetrievalID=708&hidReportRetrievalTemplateID=8>> Acesso em: 12 ago. 2013
Table 09: Soybean Oil: World Supply and Distribution

VASTAG, Z.; POPOVIC, L.; POPOVIC, S.; KRIMER, V.; PERICIN, D. **Production of enzymatic hydrolysates with antioxidant and angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity from pumpkin oil cake protein isolate.** Food Chemistry. 124: 1316-1321. 2011.

YANG, B.; YANG, H.; LI, J.; LI, Z.; JIANG, Y. **Amino acid composition, molecular weight distribution and antioxidant activity of protein hydrolysates of soy sauce lees.** Food Chemistry, Elsevier. 124: 551-555. 2011.

WAN, J.; WILCOCK, A.; COVENTRY, M.J. **The effect of essential oils of basil on the growth of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*.** Journal of Applied Microbiology. 84: 152-158. 1998.

WANG, W.; MEJIA, D.; GONZALEZ, E. **A New Frontier in Soy Bioactive Peptides that May Prevent Age-related Chronic Diseases.** Comprehensive reviews in food science and food safety, Wiley Online Library. 4: 63-78, 2005.

WHITE, S. B. **Antibacterial efficacy of phosvitin, carvacrol, or nisin alone or combined against foodborne human enteric pathogens.** Graduate Theses and Dissertations. Iowa State University. Paper 10151. 2011.

WU, J.; DING, X. **Characterization of inhibition and stability of soy-protein-derived angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides.** Food Research International, Elsevier, 35, 367-375, 2002.

ZASLOFF, M. **Antimicrobial peptides of multicellular organisms.** Nature, 415, 389-395. 2002.

ZORTÉA, M. E. B. **Estratégias de cultivo utilizando resíduos das indústrias processadoras de alimentos e óleo de soja para produção de poli(3-hidroxitirato).** Orientadora: Mônica Lady Fiorese. Conselheiro: Salah Din Mahmud Hasan. 2012. 108 f. Dissertação (Mestre em Engenharia Química, área de Processos Químicos e Bioquímicos) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Paraná, 2012.

ZHONG, F.; LIU, J.; MA, J.; SHOEMAKER, C.F. **Preparation of hypocholesterol peptides from soy protein and their hypocholesterolemic effect in mice.** Food Research International 40: 661–667. 2007.

APÊNDICE A – RESULTADOS DA OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO DAS PROTEÍNAS HIDROSSOLÚVEIS DA TORTA DE SOJA

Ensaio	pH	NaCl (%)	PTN (g/100)
1	4,6	0,3	5,571
2	4,6	1,7	8,880
3	7,4	0,3	11,328
4	7,4	1,7	8,456
5	4,0	1,0	8,971
6	8,0	1,0	9,753
7	6,0	0,0	6,032
8	6,0	2,0	8,832
9(C)	6,0	1,0	9,310
10(C)	6,0	1,0	9,722
11(C)	6,0	1,0	9,335
12(C)	6,0	1,0	9,128

*Repetição dos pontos centrais

**APÊNDICE B – RESULTADOS DO TESTE PRELIMINAR DE OBTENÇÃO
DOS HIDROLISADOS**

Amostra	pH	Temperatura	Tempo (h)	Relação enzima/proteína	Rendimento %	Halos de inibição (mm)	
						S. Enteritidis	L.monocytogenes
1	4,0	30	1	0,005	76,3	0	6
2	10,0	30	1	0,005	22,2	0	0
3	4,0	70	1	0,005	79,9	8	14
4	10,0	70	1	0,005	42,5	0	0
5	4,0	30	5	0,005	80,8	6	12
6	10,0	30	5	0,005	37,2	0	0
7	4,0	70	5	0,005	125,3	2	8
8	10,0	70	5	0,005	47,0	0	2
9	4,0	30	1	0,015	96,3	4	10
10	10,0	30	1	0,015	45,7	0	0
11	4,0	70	1	0,015	32,5	0	6
12	10,0	70	1	0,015	20,2	4	6
13	4,0	30	5	0,015	114,4	0	6
14	10,0	30	5	0,015	51,6	3	5
15	4,0	70	5	0,015	277,0	4	10
16	10,0	70	5	0,015	81,0	6	8
17 (C)	7,0	50	3	0,010	296,9	16	12
18 (C)	7,0	50	3	0,010	286,8	17	13
19 (C)	7,0	50	3	0,010	276,8	15	11
20 (C)	7,0	50	3	0,010	307,0	15	11

**APÊNDICE C – RESULTADOS DO RENDIMENTO DE HIDRÓLISE
REALIZADA COM PAPAÍNA**

AMOSTRA	pH	tº	tempo	enzima x ptn	g em 100g	% rendimento
1. hidrolisado pH 4,0	4,0	50ºC	1h	1:66,66	6,0518	25,1744
1. hidrolisado pH 4,0	4,0	50ºC	1h	1:66,66	6,0518	25,1744
1. hidrolisado pH 4,0	4,0	50ºC	1h	1:66,67	6,0988	26,1478
1. hidrolisado pH 4,0	4,0	50ºC	1h	1:66,68	7,5440	13,8889
1. hidrolisado pH 4,0	4,0	50ºC	1h	1:66,69	7,9640	20,2295
1. hidrolisado pH 4,0	4,0	50ºC	1h	1:66,70	7,8640	18,7198
1. hidrolisado pH 4,0	4,0	50ºC	1h	1:66,71	6,1040	23,1307
1. hidrolisado pH 4,0	4,0	50ºC	1h	1:66,72	6,0040	21,1135
1. hidrolisado pH 4,0	4,0	50ºC	1h	1:66,73	5,8440	17,8860
2. hidrolisado pH 7,0	7,0	50ºC	1h	1:66,66	10,6480	82,0793
2. hidrolisado pH 7,0	7,0	50ºC	1h	1:66,66	10,0880	72,5034
2. hidrolisado pH 7,0	7,0	50ºC	1h	1:66,66	10,3680	77,2914
2. hidrolisado pH 7,0	7,0	50ºC	1h	1:66,66	11,5440	66,7244
2. hidrolisado pH 7,0	7,0	50ºC	1h	1:66,66	11,8440	71,0572
2. hidrolisado pH 7,0	7,0	50ºC	1h	1:66,66	11,9440	72,5014
2. hidrolisado pH 7,0	7,0	50ºC	1h	1:66,66	9,8440	71,1802
2. hidrolisado pH 7,0	7,0	50ºC	1h	1:66,66	9,9040	72,2235
2. hidrolisado pH 7,0	7,0	50ºC	1h	1:66,66	9,9640	73,2669
3. hidrolisado pH 10,0	10,0	50ºC	1h	1:66,66	6,0480	3,4200
3. hidrolisado pH 10,0	10,0	50ºC	1h	1:66,66	6,1680	5,4720
3. hidrolisado pH 10,0	10,0	50ºC	1h	1:66,66	6,2080	6,1560
3. hidrolisado pH 10,0	10,0	50ºC	1h	1:66,66	8,2440	10,6478
3. hidrolisado pH 10,0	10,0	50ºC	1h	1:66,66	8,3440	11,9900
3. hidrolisado pH 10,0	10,0	50ºC	1h	1:66,66	8,5040	14,1374
3. hidrolisado pH 10,0	10,0	50ºC	1h	1:66,66	6,3440	12,8023
3. hidrolisado pH 10,0	10,0	50ºC	1h	1:66,66	6,3240	12,4467
3. hidrolisado pH 10,0	10,0	50ºC	1h	1:66,66	6,2840	11,7354
4. branco pH 4,0	4,0	50ºC	1h	1:66,66	4,8347	
4. branco pH 4,0	4,0	50ºC	1h	1:66,66	6,6240	
4. branco pH 4,0	4,0	50ºC	1h	1:66,66	4,9573	
5. branco pH 7,0	7,0	50ºC	1h	1:66,66	5,8480	
5. branco pH 7,0	7,0	50ºC	1h	1:66,66	6,9240	
5. branco pH 7,0	7,0	50ºC	1h	1:66,66	5,7507	
6. branco pH 10,0	10,0	50ºC	1h	1:66,66	5,8480	
6. branco pH 10,0	10,0	50ºC	1h	1:66,66	7,4507	
6. branco pH 10,0	10,0	50ºC	1h	1:66,66	5,6240	

**APÊNDICE D – RESULTADOS DO RENDIMENTO DE HIDRÓLISE
REALIZADA COM PEPSINA**

AMOSTRA	Ph	tº	tempo	enzima x ptn	g em 100g	% rendimento
2.1 Hidrolisado pH 2,0	2,0	50°C	1h	1:66,66	12,9840	80,9028
2.1 Hidrolisado pH 2,0	2,0	50°C	1h	1:66,66	13,1840	83,6894
2.1 Hidrolisado pH 2,0	2,0	50°C	1h	1:66,66	12,8040	78,3949
2.1 Hidrolisado pH 2,0	2,0	50°C	1h	1:66,66	12,1640	78,0793
2.1 Hidrolisado pH 2,0	2,0	50°C	1h	1:66,66	12,2840	79,8360
2.1 Hidrolisado pH 2,0	2,0	50°C	1h	1:66,66	12,1840	78,3720
2.2 Hidrolisado pH 5,0	5,0	50°C	1h	1:66,66	7,8040	24,3203
2.2 Hidrolisado pH 5,0	5,0	50°C	1h	1:66,66	7,8840	25,5947
2.2 Hidrolisado pH 5,0	5,0	50°C	1h	1:66,66	8,1840	30,3738
2.2 Hidrolisado pH 5,0	5,0	50°C	1h	1:66,66	7,5440	23,5911
2.2 Hidrolisado pH 5,0	5,0	50°C	1h	1:66,66	8,0840	32,4377
2.2 Hidrolisado pH 5,0	5,0	50°C	1h	1:66,66	7,7840	27,5229
2.3 branco pH 2,0	2,0	50°C	1h	1:66,66	7,1773	
2.3 branco pH 2,0	2,0	50°C	1h	1:66,66	6,8307	
2.4 branco pH 5,0	5,0	50°C	1h	1:66,66	6,2773	
2.4 branco pH 5,0	5,0	50°C	1h	1:66,66	6,1040	

**APÊNDICE E – ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS DO
RENDIMENTO DE HIDRÓLISES REALIZADAS COM PAPAÍNA E PEPSINA**

Amostra	Rendimento de reação (%)
Papaína	
Hidrolisado em pH 4,0	21,3 ^a
Hidrolisado em pH 7,0	73,2 ^b
Hidrolisado em pH 10,0	9,9 ^c
Pepsina	
Hidrolisado em pH 2,0	79,9 ^x
Hidrolisado em pH 5,0	27,3 ^y

Papaína: Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo método de ANOVA, seguido do teste de Tukey. Pepsina: médias seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo teste de t.

APÊNDICE F – HALOS DE INIBIÇÃO (mm) DAS REPETIÇÕES PARA *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *B. cereus* (papaína)

***S. aureus*: Hidrólise realizada com papaína (valores em mm)**

Hidrolisado pH 4,0	Branco pH 4,0	Hidrolisado pH 7,0	Branco pH 7,0	Hidrolisado pH 10	Branco pH 10,0
22	21	19	15	21	16
21	22	19	15	21	16
21	21	20	14	21	16
18	21	15	15	14	15
16	21	17	15	17	15
16	21	17	15	17	15
22	21	18	12	19	15
23	21	18	12	18	16
23	20	19	13	18	14

***L. monocytogenes*: Hidrólise realizada com papaína (valores em mm)**

Hidrolisado pH 4,0	Branco pH 4,0	Hidrolisado pH 7,0	Branco pH 7,0	Hidrolisado pH 10	Branco pH 10,0
21	21	21	16	20	19
21	22	20	17	20	17
21	20	22	16	20	16
19	17	20	11	20	20
19	16	20	11	20	17
19	17	19	11	21	17
24	25	21	18	21	18
24	26	23	18	21	17
24	26	21	18	21	22

***B. cereus*: Hidrólise realizada com papaína (valores em mm)**

Hidrolisado pH 4,0	Branco pH 4,0	Hidrolisado pH 7,0	Branco pH 7,0	Hidrolisado pH 10	Branco pH 10,0
26	25	14	15	18	16
25	25	18	16	20	17
25	23	18	15	19	18
26	28	21	23	19	24
26	28	23	23	23	24
26	27	25	23	25	25
26	24	25	20	27	23
26	23	25	19	25	23
28	24	25	19	25	23

APÊNDICE G – HALOS DE INIBIÇÃO (mm) DAS REPETIÇÕES PARA *S. Enteritidis*, *S. Brasil* e *E. coli* (papaína)

***S. Enteritidis*: Hidrólise realizada com papaína (valores em mm)**

Hidrolisado pH 4,0	Branco pH 4,0	Hidrolisado pH 7,0	Branco pH 7,0	Hidrolisado pH 10	Branco pH 10,0
17	17	14	12	13	11
17	18	14	11	14	12
18	17	15	11	15	11
11	12	12	10	11	10
12	13	12	10	11	10
11	13	12	11	11	10
17	15	13	11	11	12
17	15	14	11	11	12
18	14	14	10	12	12

***S. Brasil*: Hidrólise realizada com papaína (valores em mm)**

Hidrolisado pH 4,0	Branco pH 4,0	Hidrolisado pH 7,0	Branco pH 7,0	Hidrolisado pH 10	Branco pH 10,0
17	17	16	10	15	10
18	17	15	10	15	10
18	16	15	10	15	10
18	16	14	15	15	16
16	14	15	15	15	16
16	14	15	14	16	17
17	15	13	12	19	17
17	15	15	12	19	17
16	15	14	12	19	15

***E. coli*: Hidrólise realizada com papaína (valores em mm)**

Hidrolisado pH 4,0	Branco pH 4,0	Hidrolisado pH 7,0	Branco pH 7,0	Hidrolisado pH 10	Branco pH 10,0
12	13	12	12	14	10
12	13	12	13	14	12
13	14	12	12	13	10
14	14	12	12	10	12
15	15	15	13	13	12
15	15	15	13	12	12
19	15	16	15	15	14
18	15	15	16	15	14
18	15	16	14	15	14

APÊNDICE H – HALOS DE INIBIÇÃO (mm) DAS REPETIÇÕES PARA *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *B. cereus* (pepsina)

***S. aureus*: Hidrólise realizada com pepsina (valores em mm)**

Hidrolisado pH 2,0	Branco pH 2,0	Hidrolisado pH 5,0	Branco pH 5,0
21	20	22	22
21	20	22	22
20	18	22	21
20	17	21	21
20	17	21	21
19	16	21	20
18	16	20	20
18	16	20	20
18	16	20	19

***L. monocytogenes*: Hidrólise realizada com pepsina (valores em mm)**

Hidrolisado pH 2,0	Branco pH 2,0	Hidrolisado pH 5,0	Branco pH 5,0
25	24	27	28
25	23	27	28
23	23	27	28
23	23	27	27
22	23	27	27
22	21	26	26
22	21	26	26
21	20	26	26
21	20	20	26

***B. cereus*: Hidrólise realizada com pepsina (valores em mm)**

Hidrolisado pH 2,0	Branco pH 2,0	Hidrolisado pH 5,0	Branco pH 5,0
26	23	28	25
26	23	28	25
26	23	27	25
25	20	27	25
25	20	27	24
25	20	27	24
20	20	23	22
20	20	23	22
20	20	23	22

APÊNDICE I – HALOS DE INIBIÇÃO (mm) DAS REPETIÇÕES PARA *S. Enteritidis*, *S. Brasil* e *E. coli* (pepsina)

***S. Enteritidis*: Hidrólise realizada com pepsina (valores em mm)**

Hidrolisado pH 2,0	Branco pH 2,0	Hidrolisado pH 5,0	Branco pH 5,0
16	14	20	19
16	14	20	19
15	14	17	18
15	14	17	17
15	14	17	17
14	14	17	16
14	14	17	16
14	13	17	16
14	10	17	16

***S. Brasil*: Hidrólise realizada com pepsina (valores em mm)**

Hidrolisado pH 2,0	Branco pH 2,0	Hidrolisado pH 5,0	Branco pH 5,0
16	15	19	16
15	15	19	16
15	15	19	16
15	15	19	15
15	15	18	15
15	14	18	15
15	14	18	14
15	14	17	14
14	11	17	14

***E. coli*: Hidrólise realizada com pepsina (valores em mm)**

Hidrolisado pH 2,0	Branco pH 2,0	Hidrolisado pH 5,0	Branco pH 5,0
16	16	21	20
16	16	20	20
15	16	19	20
15	13	18	20
14	13	18	18
14	13	16	18
14	11	16	17
14	11	16	17
14	11	16	17