UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Bioprocesso, purificação e caracterização das peptidases produzidas pelos fungos *Eupenicillium javanicum* e *Myceliophthora thermophila* e avaliação da produção de peptídeos biologicamente ativos

Youssef Ali Abou Hamin Neto

Ribeirão Preto
2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Bioprocesso, purificação e caracterização das peptidases produzidas pelos fungos *Eupenicillium javanicum* e *Myceliophthora thermophila* e avaliação da produção de peptídeos biologicamente ativos

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientado: Youssef Ali Abou Hamin Neto

Orientador: Prof. Dr. Hamilton Cabral

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentado ao apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 29/03/2017. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2017

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Hamin Neto, Youssef Ali Abou
Bioprocesso, purificação e caracterização das peptidases produzidas pelos fungos Eupenicillium javanicum e Myceliophthora thermophila e avaliação da produção de peptídeos biologicamente ativos. Ribeirão Preto, 2017.
193 p.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.
Orientador: Cabral, Hamilton.

1. Peptídeos bioativos. 2. Peptidases fúngicas. 3. Bioprocesso.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Youssef Ali Abou Hamin Neto
Bioprocesso, purificação e caracterização das peptidases produzidas pelos fungos *Eupenicillium javanicum* e *Myceliophthora thermophila* e avaliação da produção de peptídeos biologicamente ativos

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: Prof. Dr. Hamilton Cabral

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof.Dr._____
Instituição:_____
Assinatura:_____

Prof. Dr._____
Instituição:_____
Assinatura:_____

Prof.Dr._____
Instituição:_____
Assinatura:_____

Prof.Dr._____
Instituição:_____
Assinatura:_____

Prof.Dr._____
Instituição:_____
Assinatura:_____

Dedico este trabalho aos meus pais
Zalfa e Ali (in memoriam),
e ao meu irmão Amir.

Agradecimentos

Agradeço a todos aqueles que contribuíram diretamente e indiretamente para a conclusão deste trabalho.

Aos meus pais, Ali (in memoriam) e Zalfa, por proporcionarem todo o alicerce para eu alcançar meus objetivos, e ao meu irmão Amir pelo apoio e companheirismo.

Aos meus companheiros de laboratório e orientador Prof. Dr. Hamilton Cabral, que se tornaram grandes amigos e contribuíram de forma ativa para esta pesquisa, sem eles não conseguiria finalizar este trabalho, em especial à Ana Claúdia Rodrigues de Siqueira, Luciana Barbosa Coitinho e Nathália Gonsales da Rosa Garzon.

Aos meus amigos, por sempre incentivarem o meu crescimento e vibrarem junto comigo a cada conquista.

Aos colaboradores do projeto, Prof.ª Dr.ª Niege Araçari Jacometti Cardoso Furtado, Prof.ª Dr.ª Andreia Machado Leopoldino, Maria Angélica dos Santos Cunha Chellegatti e Lays Martin Sobral.

À fonte de fomento FAPESP bela bolsa concedida, Processo: 2012/18278-2.

RESUMO

HAMIN NETO, Y. A. A. **Bioprocesso, purificação e caracterização das peptidases produzidas pelos fungos *Eupenicillium javanicum* e *Myceliophthora thermophila* e avaliação da produção de peptídeos biologicamente ativos**. 2017. 217f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

O Câncer é uma doença responsável pelos maiores índices de morbidade e mortalidade em todo o mundo. A ocorrência do câncer é relacionada com vários fatores, entre eles, ambientais, nutricionais, genéticos, infecções virais e estilo de vida. Devido a complexidade da doença, há uma busca incessante em novos tratamentos. Atualmente, os medicamentos conhecidos, além de danificar células anormais prejudicam células saudáveis, o que causa efeitos colaterais e toxicidade. Algumas moléculas, por exemplo peptídeos, possuem a capacidade de interagir com proteínas de membrana de células cancerígenas, atuando diretamente nestas células. Estes peptídeos podem ser obtidos a partir da hidrólise de diferentes fontes de proteínas com a utilização de peptidases de origem microbiana. O objetivo do presente estudo foi produzir e purificar peptidases de dois fungos, *Eupenicillium javanicum* e *Myceliophthora thermophila*, realizar ensaios de caracterização bioquímica e eficiência catalítica destas enzimas, aplica las na obtenção de peptídeos bioativos a partir de proteínas do leite, ovo e gelatina, e avaliar a atividade antioxidante (*in vitro*) e atividade antitumoral (*in vitro* e *in vivo*) destes peptídeos. Foram produzidas e purificadas duas peptidases, uma metalopeptidase (*E. javanicum*) e uma serinopeptidase (*M. thermophila*), o ensaio de cinética enzimática mostrou maior eficiência catalítica na utilização de substratos com alanina na posição P'^{2} e tirosina na posição P'^{1} da cadeia polipeptídica, respectivamente para cada uma das enzimas. Os peptídeos, produzidos a partir de caseína, apresentaram maior atividade de sequestro de radicais e de quelar ferro. Peptídeos de soro de leite e gelatina inibiram o crescimento de células tumorais de câncer oral e melanoma (*in vitro*). Peptídeos de soro de leite produzidos por ambas as peptidases reduziram o volume tumoral (células Cal27) em camundongos imunodepriminidos. Ensaios proteômicos destes tumores, com comparação entre grupos tratados e sem tratamento, mostraram que algumas vias envolvidas com a apoptose podem estar envolvidas na redução do volume dos tumores do camundongos tratados com peptídeos obtidos de soro de leite.

Palavras chaves: atividade antitumoral, *Eupenicillium javanicum*, *Myceliophthora thermophila*, peptidases, peptídeos bioativos.

ABSTRACT

HAMIN NETO, Y. A. A. **Bioprocess, purification and characterization of the peptidases produced by the fungi *Eupenicillium javanicum* and *Myceliophthora thermophila* and evaluation of the production of biologically active peptides**. 2017. 217f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

The cancer is a disease responsible to the higher levels of mortality and morbity around the world. This disease is related to many factors, as environment, nutrition, genetic, virus infection and life style.The complexity of this disease increases the research of new treatments. Currently, the medicines damage both, normal and cancer cells, it promotes side effects and toxicity. Some molecules present specificity and bind to proteins from membranes of cancer cells, some examples are peptides. Peptides can be obtained from proteins by hydrolisys with microrbial proteases. The aim of this study was to produce and purify two proteases from fungi, *Eupenicillium javanicum* and *Myceliophthora thermophila*. Biochemical characterization and kinetic assays of these enzymes were evaluated. And then, the proteases were applied on obtention of peptides from milk, egg and gelatin proteins, and the antioxidant (in vitro) and antitumoral activity (in vitro e in vivo) of these peptides were evaluated. The purified enzymes belong to metalo (E. javanicum) and serine (M. thermophila) protease classes, the kinetic assay showed higher catalytic efficiency with tyrosine at P'^{1} position and alanine at P'^{2} position of polypeptide chain of substrate, to metalo and serine protease, respectively. The peptides from casein presented capacity to scavenge free radicals and to quelate iron. Peptides derived from whey and gelatin inhibited the grown of oral cancer and melanoma cells (in vitro). Peptides obtained from whey decreased the tumor volume of immunosupressed mice. Proteomic assays of these tumors, when compared treatment and control group, showed that peptides can be envolved in some apoptosys pathway and it influences the tumor volume, cosequently, it is decreased on treatment with peptides derived from milk whey.
Keywords: antitumor activity, bioactive peptides, *Eupenicillium javanicum*, *Myceliophthora thermophila*, peptidases.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Panorama geral de todas as etapas realizadas no estudo, desde a produção das peptidases até a aplicação na produção de peptídeos, seguido da avaliação de atividade biológica. **18**

Figura 2. Esquema da funcionalidade do substrato peptídico com supressão intramolecular de fluorescência demonstrando as diferenças de fluorescência na forma íntegra (intacta) do substrato e na forma hidrolisada por ação enzimática (SANTOS, 2009). **26**

Figura 3. Esquema proposto por Schechter e Berger (1967) no qual o sítio catalítico da peptidase é dividido em subsítios, e cada subsítio possui um aminoácido correspondente no substrato, modificado de (GRAHN et al., 1999). **32**

Figura 4. Perfil de eluição do extrato bruto proveniente do bioprocesso submerso do fungo *Eupenicillium javanicum*, utilizando a resina Superdex 75, com eluição isocrática, utilizando tampão Tris-HCl 50 mM + 150 mM de NaCl, pH 8,0. A vazão foi mantida em 0,62 mL/min e foram coletadas frações de 5 mL. **55**

Figura 5. Perfil de eluição da cromatografia de troca iônica com resina Source 15Q. A eluição foi em gradiente salino linear de 0 a 100 mM de NaCl, em tampão tris-HCl 50 mM, pH 8,0. A vazão foi mantida em 0,3 mL/min e foram coletadas frações de 1 mL. **55**

Figura 6. Imagem do gel SDS-PAGE 12 %, corado com nitrato de prata da enzima purificada produzida pelo fungo *Eupenicillium javanicum*. (A) marcador de baixa massa molecular (LMW-SDS Marker Kit – GE) e (B) peptidase purificada, após as etapas de cromatografia em resina Superdex 75 (exclusão de massa molecular) e resina Source 15Q (aniônica), respectivamente. **56**

Figura 7. Influência dos diferentes valores de pH sobre a atividade proteolítica da peptidase purificada do fungo *Eupenicillium javanicum*. A atividade proteolítica foi determinada em triplicata com substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp a 45 °C. **57**

Figura 8. Estabilidade da peptidase isolada do bioprocesso submerso do fungo *Eupenicillium javanicum*, frente à exposição a diferentes valores de pH durante 60 minutos a 25 ºC. A atividade proteolítica foi determinada em triplicata com substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp a 55 °C, pH 6,0. **58**

Figura 9. Influência de diferentes temperaturas sobre a atividade proteolítica da peptidase isolada do bioprocesso submerso do fungo *Eupenicillium javanicum*. A atividade proteolítica foi determinada em triplicata com substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp em pH 6,0. **59**

Figura 10. Estabilidade da peptidase isolada do bioprocesso submerso do fungo *Eupenicillium javanicum*, frente à exposição a diferentes temperaturas e tempos. A atividade proteolítica foi determinada em triplicata com substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp a 55 °C, pH 6,0. **60**

Figura 11. Influência dos surfactantes Triton™ X-100 e Tween ® 20 sobre a atividade proteolítica da peptidase isolada do bioprocesso submerso do fungo *Eupenicillium javanicum*. O ensaio foi determinado em triplicata na presença do substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp a 55 °C, em pH 6,0. **65**

Figura 12. Influência dos surfactantes CTAB e SDS sobre a atividade proteolítica da peptidase isolada do bioprocesso submerso do fungo *Eupenicillium javanicum*. O ensaio foi determinado em triplicata na presença do substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp a 55 °C, em pH 6,0. **66**

Figura 13. Influência das substâncias DTT, guanidina e ureia, sobre a atividade proteolítica da peptidase isolada do bioprocesso submerso do fungo *Eupenicillium* **68**

javanicum. O ensaio foi determinado em triplicata na presença do substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp a 55 °C, em pH 6,0.
Figura 14. Perfil de eluição do processo cromatográfico do extrato bruto produzido por bioprocesso submerso pelo fungo *Myceliophtora thermophila*, utilizando a resina Source 15Q (aniônica), com gradiente salino de 0 a 150 mM de NaCl, em tampão tris-HCl 50 mM, pH 8,0. A vazão foi mantida em 0,3 mL/min e foram coletadas frações de 1 mL. **79**
Figura 15. Perfil de eluição do processo cromatográfico proveniente das proteínas obtidas da cromatografia em resina Source 15Q. A resina utilizada foi fenil sepharose, a eluição em gradiente de dessalinização de 750 a 0 mM de sulfato de amônio em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0. A vazão foi mantida em 0,3 mL/min e foram coletadas frações de 1 mL. **79**
Figura 16. Imagem do gel SDS-PAGE 12 %, corado com nitrato de prata da peptidase isolada do bioprocesso submerso do fungo *Myceliophtora thermophila*, após processos cromatográficos. (A) marcador de baixa massa molecular (LMW-SDS Marker Kit – GE) e (B) peptidase purificada. **80**
Figura 17. Influência dos diferentes valores de pH sobre a atividade proteolítica da peptidase isolada do bioprocesso submerso do fungo *Myceliophthora thermophila*. A atividade proteolítica foi determinada em triplicata com substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp a 45 °C. **81**
Figura 18. Estabilidade da peptidase isolada do bioprocesso submerso do fungo *Myceliophthora thermophila*, frente à exposição a diferentes valores de pH durante 60 minutos a 25 ºC. A atividade proteolítica foi determinada em triplicata com substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp a 45 °C, pH 6,5. **82**
Figura 19. Influência da variação de temperaturas sobre a atividade proteolítica da peptidase isolada do bioprocesso submerso do fungo *Myceliophthora thermophila*. A atividade proteolítica foi determinada em triplicata com substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp em pH 6,5. **83**
Figura 20. Estabilidade da peptidase isolada do bioprocesso submerso do fungo *Myceliophthora thermophila*, frente à exposição a diferentes temperatura e tempos. A atividade proteolítica foi determinada em triplicata com substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp a 45 °C, pH 6,5. **84**
Figura 21. Influência dos surfactantes CTAB, SDS, Triton™ X-100 e Tween ® 20 sobre a atividade proteolítica da peptidase isolada do bioprocesso submerso do fungo *Myceliophthora thermophila*. O ensaio foi realizado em triplicata na presença do substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp a 45 °C, em pH 6,5. **88**
Figura 22. Influência das substâncias DDT, guanidina e ureia, sobre a atividade proteolítica da peptidase isolada do bioprocesso submerso do fungo *Myceliophthora thermophila*. O ensaio foi realizado em triplicata na presença do substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp a 45 °C, em pH 6,5. **90**
Figura 23. Grau de hidrólise dos substratos albumina (a), caseína (b) e soro de leite (c) após reação com as enzimas de origem microbianas (*E. javanicum* e *M. thermophila*) e comercial (tripsina). A reação foi conduzida em diferentes tempos (3, 6, 9 e 12 horas), a 45 ºC e 200 rpm. **100**
Figura 24. Viabilidade celular de linhagen tumoral Cal27 frente a hidrolisados proteicos de albumina de ovo, caseína e soro de leite (4,0 mg / mL). Hidrolisados obtidos utilizando a enzima comercial (tripsina Sigma Aldrish®) e enzimas produzidas por *Eupenicillium javanicum* (A) e *Myceliophthora thermophila* (B) sob bioprocesso submerso, a hidrólise ocorreu após 12 horas, 200 rpm e 45 ºC. Os resultados foram comparados entre o controle positivo (DMSO), controle negativo **113**

(água), e hidrolisados de tripsina e as enzima fúngica. O ensaio de viabilidade foi testada utilizando resazurina após 24, 48 e 72 horas.

Figura 25. Viabilidade celular de linhagen tumoral GN (a) e NOK (a) frente a hidrolisados proteicos de albumina de ovo, caseína e soro de leite (4,0 mg / mL). Hidrolisados obtidos utilizando a enzima comercial (tripsina Sigma Aldrish®) e enzimas produzidas por *Eupenicillium javanicum* e *Myceliophthora thermophila* sob bioprocesso submerso, a hidrólise ocorreu após 12 horas, 200 rpm e 45 ºC. Os resultados foram comparados entre o controle positivo (DMSO), controle negativo (água), e hidrolisados de tripsina e as enzima fúngica. O ensaio de viabilidade foi testada utilizando resazurina após 24, 48 e 72 horas. **114**

Figura 26. Viabilidade celular de linhagen tumoral B16F10 frente a hidrolisados proteicos de albumina de ovo, caseína e soro de leite (4,0 mg / mL). Hidrolisados obtidos utilizando a enzima comercial (tripsina Sigma Aldrish®) e enzimas produzidas por *Eupenicillium javanicum* (a) e *Myceliophthora thermophila* (b) sob bioprocesso submerso, a hidrólise ocorreu após 12 horas, 200 rpm e 45 ºC. Hidrolisados de gelatina gerados pela enzima de *M. thermophila* na mesmas condições também foram testados (c). Os resultados foram comparados entre o controle positivo (DMSO), controle negativo (água), e hidrolisados de tripsina e as enzima fúngica. O ensaio de viabilidade foi testada utilizando resazurina após 24, 48 e 72 horas. **115**

Figura 27. Evolução do volume de tumores de xenoenxerto de células Cal27 em camundongos Balb/c nude, durante o tratamento com peptídeos derivados de proteínas do soro de leite, produzidos por hidrólise com enzima microbiana secretada pelo fungo *E. javanicum* (ES) ou *M. thermophila* (MS). O tratamento foi com 10 µL de injeções intratumorais de solução 50 µg/µL de peptídeos a cada 72 horas durante 82 dias, o controle foi tratado nas mesmas condições apenas com solução salina. **117**

Figura 28. Representação de tumores de xenoenxerto de células Cal27 em camundongos Balb/c nude, após o tratamento com peptídeos derivados de proteínas do soro de leite, produzidos por hidrólise com enzima microbiana secretada pelo fungo *E. javanicum* (ES) ou *M. thermophila* (MS). O tratamento foi com 10 µL de injeções intratumorais de solução 50 µg/µL de peptídeos a cada 72 horas durante 82 dias, o controle foi tratado nas mesmas condições apenas com solução salina. **118**

Figura 29. Representação do gel bidimensional de proteínas extraídas de células Cal27 após o tratamento *in vitro* com peptídeos bioativos. (A) Controle (água), (B) Tratamento ES (4 mg/mL), (C) Tratamento MS (4 mg/mL). O marcador de massa molecular utilizado foi o LMW-SDS Marker Kit com o seguinte padrão de bandas 97, 66, 45, 30, 20,1 e 14,4 kDa. Os géis com gradiente de pH linear imobilizado (13 cm, pH 3-10) foram carregados com 150 µg de proteínas totais e corados com solução de *Coomassie* coloidal G-250. **119**

Figura 30. Sugestão de um dos possíveis mecanismo de ação dos peptídeos derivados de soro de leite contra as células de linhagem tumoral Cal27 após exposição por 72 horas ao tratamento. **130**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Etapas de purificação da peptidase produzida pelo fungo *Eupenicillium javanicum*, pelo bioprocesso submerso com pH inicial de 5,0, durante 144 horas, 30 °C e 120 rpm. **54**

Tabela 2. Influência de íons metálicos sobre a atividade proteolítica da peptidase isolada do bioprocesso submerso do fungo *Eupenicillium javanicum*. O ensaio foi determinado em triplicata na presença do substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp a 55 °C, em pH 6,0, a concentração final dos íons foi de 5 mM. **62**

Tabela 3. Influência de inibidores sobre a atividade proteolítica de peptidase purificada do extrato enzimático produzido pelo fungo *Eupenicillium javanicum* sob bioprocesso submerso. O ensaio foi determinado em triplicata na presença do substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp a 55°C, em pH 6,0, a concentração final dos inibidores foi de 5 mM. **64**

Tabela 4. Determinação dos parâmetros cinéticos dos subsítios (S_1, S_2 e S_3), da peptidase isolado do bioprocesso do fungo *Eupenicillium javanicum*. O ensaio foi conduzido em duplicata com substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp e substituições nas posições (P_1, P_2 e P_3), a 55 ºC e pH 6,0. **70**

Tabela 5. Determinação dos parâmetros cinéticos dos subsítios (S'_1, S'_2 e S'_3), da peptidase isolada do bioprocesso submerso do fungo *Eupenicillium javanicum*. O ensaio foi conduzido em duplicata com substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp e substituições nas posições (P'_1, P'_2 e P'_3), a 55 ºC e pH 6,0. **74**

Tabela 6. Etapas de purificação da peptidase produzida pelo fungo *Myceliophtora thermophila* pelo bioprocesso submerso, com pH inicial 5,0, durante 48 horas a 45 °C, a 120 rpm. **78**

Tabela 7. Influência de íons metálicos sobre a atividade proteolítica da peptidase isolada do bioprocesso submerso do fungo *Myceliophthora thermophila*. O ensaio foi realizado em triplicata na presença do substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp a 45 °C, em pH 6,5, a concentração final dos íons foi de 5 mM. **86**

Tabela 8. Influência de inibidores sobre a atividade proteolítica da peptidase isolada do extrato enzimático produzido pelo fungo *Myceliophthora thermophila* sob bioprocesso submerso. O ensaio foi realizado em triplicata na presença do substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp a 45°C, em pH 6,5, a concentração final dos inibidores foi de 5 mM. **87**

Tabela 9. Determinação dos parâmetros cinéticos dos subsítios (S_1, S_2 e S_3), da peptidase isolado do bioprocesso do fungo *Myceliophthora thermophila*. O ensaio foi conduzido em duplicata com substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp e substituições nas posições (P_1, P_2 e P_3), a 45 ºC e pH 6,5. **92**

Tabela 10. Determinação dos parâmetros cinéticos dos subsítios (S'_1, S'_2 e S'_3), da peptidase isolada do bioprocesso do fungo *Myceliophthora thermophila*. O ensaio foi conduzido em duplicata com substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp e substituições nas posições (P'_1, P'_2 e P'_3), a 45 ºC e pH 6,5. **95**

Tabela 11. Atividade de sequestro de radical livre DPPH e atividade de quelar ferro do hidrolisado do substrato albumina, em relação ao tempo de reação com a enzima isolada do bioprocesso submerso do fungo *Eupenicillium javanicum*. **103**

Tabela 12. Atividade de sequestro de radical livre DPPH e atividade de quelar ferro do hidrolisado do substrato caseína, em relação ao tempo de reação com a enzima isolada do bioprocesso submerso do fungo *Eupenicillium javanicum*. **104**

Tabela 13. Atividade de sequestro de radical livre DPPH e atividade de quelar ferro do hidrolisado do substrato soro de leite, em relação ao tempo de reação com a enzima isolada do bioprocesso submerso do fungo *Eupenicillium javanicum*. **105**
Tabela 14. Atividade de sequestro de radical livre DPPH e atividade de quelar ferro do hidrolisado do substrato albumina, em relação ao tempo de reação com a enzima isolada do bioprocesso submerso do fungo *Myceliophthora thermophila*. **106**
Tabela 15. Atividade de sequestro de radical livre DPPH e atividade de quelar ferro do hidrolisado do substrato caseína, em relação ao tempo de reação com a enzima isolada do bioprocesso submerso do fungo *Myceliophthora thermophila*. **106**
Tabela 16. Atividade de sequestro de radical livre DPPH e atividade de quelar ferro do hidrolisado do substrato caseína, em relação ao tempo de reação com a enzima isolada do bioprocesso submerso do fungo *Myceliophthora thermophila*. **107**
Tabela 17. Atividade de sequestro de radical livre DPPH e atividade de quelar ferro do hidrolisado do substrato albumina, considerando-se o tempo de hidrólise pela a enzima comercial tripsina (Sigma Aldrish®). **108**
Tabela 18. Atividade de sequestro de radical livre DPPH e atividade de quelar ferro do hidrolisado do substrato caseína, considerando-se o tempo de hidrólise pela a enzima comercial tripsina (Sigma Aldrish®). **108**
Tabela 19. Atividade de sequestro de radical livre DPPH e atividade de quelar ferro do hidrolisado do substrato soro de leite, considerando-se o tempo de hidrólise pela a enzima comercial tripsina (Sigma Aldrish®). **109**
Tabela 20. Lista de proteínas intracelulares de células da linhagem celular Cal27 após o tratamento com 4 mg/mL de peptídeos bioativos (ES e MS) e água. **121**
Tabela 21. Classificação da função molecular das sequências proteicas identificadas no proteoma de células de melanoma B16F10 após 48 horas de tratamento com soluções de peptídeos ou água (controle). **131**
Tabela 22. Categorização por escore da função molecular das sequências proteicas identificadas no proteoma de células de melanoma B16F10 do tratamento ES, após 48 horas. **133**
Tabela 23. Categorização por escore da função molecular das sequências proteicas identificadas no proteoma de células de melanoma B16F10 do tratamento MG após 48 horas. **134**
Tabela 24. Classificação dos processos biológicos nos quais as sequências proteicas identificadas no proteoma de células de melanoma B16F10, após 48 horas do tratamento ES, estão envolvidas. **135**
Tabela 25. Classificação dos processos biológicos nos quais as sequências proteicas identificadas no proteoma de células de melanoma B16F10, após 48 horas de tratamento MG, estão envolvidas. **136**
Tabela 26. Categorização por escore dos processos biológicos das sequências proteicas identificadas no proteoma de células de melanoma B16F10 do tratamento ES após 48 horas. **138**
Tabela 27. Categorização por escore dos processos biológicos das sequências proteicas identificadas no proteoma de células de melanoma B16F10 do tratamento MG após 48 horas. **139**
Tabela 28. Classificação da função molecular das sequências proteicas identificadas no proteoma do tumor de células Cal27 desenvolvido em camundongos Balb/C nude nos diferentes tratamentos com 500 µg de peptídeos bioativos a cada 48 horas durante 82 dias. O tratamento do grupo controle foi feito nas mesmas condições apenas com solução salina. **142**

Tabela 29. Categorização por escore das funções moleculares das sequências proteicas identificadas no proteoma do tumor de células Cal27 após o tratamento com 500 µg de peptídeos bioativos ES a cada 48 horas durante 82 dias. **142**
Tabela 30. Categorização por escore das funções moleculares das sequências proteicas identificadas no proteoma do tumor de células Cal27 após o tratamento com 500 µg de peptídeos bioativos MS a cada 48 horas durante 82 dias. **143**
Tabela 31. Classificação dos processos biológicos nos quais as sequências proteicas identificadas no proteoma do tumor de células Cal27 após o tratamento com 500 µg de peptídeos bioativos ES ou MS a cada 48 horas durante 82 dias. **145**
Tabela 32. Categorização por escore dos processos biológicos das sequências proteicas identificadas no proteoma do tumor de células Cal27 após o tratamento com 500 µg de peptídeos bioativos ES a cada 48 horas durante 82 dias. **147**
Tabela 33. Categorização por escore dos processos biológicos das sequências proteicas identificadas no proteoma do tumor de células Cal27 após Cal27 após o tratamento com 500 µg de peptídeos bioativos MS a cada 48 horas durante 82 dias. **147**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE ABREVIATURA DE AMINOÁCIDOS

Aminoácido	Abreviatura – Três letras	Abreviatura – Uma letra
ALANINA	Ala	A
ASPARAGINA	Asn	N
ÁCIDO ASPÁRTICO	Asp	D
ARGININA	Arg	R
CISTEÍNA	Cys	C
FENILALANINA	Phe	F
GLICINA	Gly	G
GLUTAMINA	Gln	Q
ÁCIDO GLUTÂMICO	Glu	E
HISTIDINA	His	H
ISOLEUCINA	Ile	I
LEUCINA	Leu	L
LISINA	Lys	K
METIONINA	Met	M
PROLINA	Pro	P
SERINA	Ser	S
TIROSINA	Tyr	Y
TREONINA	Thr	T
TRIPTOFANO	Trp	W
VALINA	Val	V

A	Absorbância
A_0	Absorbância do branco
ABTS	Ácido 2,2 azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico
Abz	Ácido orto-aminobenzóico
ACN	Acetonitrila
ADH	*Yeast Alcohol Dehydrogenase*
AE	Atividade específica
AIA	Ácido iodoacético
ALDO	Frutose bifosfato aldolase
AMPs	Peptídeos antimicrobianos

ATP	Adenosina trifosfato
BICINE	*N*,*N*-Bis(2-hydroxietil)glicina
BHT	Hidroxitolueno butilado
BLAST	Ferramenta básica de alinhamento local e busca
BSA	Soro de albumina bovino
CAPS	Ácido 3-(cicloexilamino)-1-propanosulfônico
CEC	Carcinoma de células escamosas
CHAPS	3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato
CID	Dissociação induzida pela colisão
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamonio
DPPH	2,2'-difenil-β-picrilhidrazil
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNEM	*Dulbecco's modified eagle's medium* – Meio Eagle modificado por Dulbecco
Dpi	*Dots per inch* – Pontos por polegada
DTT	Ditiotreitol
EA	Enzima isolada do fungo *Eupenicillium javanicum* + albumina
EB	Extrato enzimático bruto
EC	Enzima isolada do fungo *Eupenicillium javanicum* + caseína
ES	Enzima isolada do fungo *Eupenicillium javanicum* + soro de leite
EC	*Enzyme comission number*
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EDDnp	Grupo etilenodiamo-dinitro-fenil
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
ERRO	Espécies reativas de oxigênio
FBS	Soro fetal bovino
FDR	*False Discovery rate*
Ferrozine	3-(2-piridil)-5,6-bis-(4-ácido fenil sulfônico) -1,2,4-triazina
FRET	substrato peptídico sintético com supressão intramolecular de fluorescência
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GN	Fibroblasto de tecido gengival normal
GRAS	G*eralmente reconhecido como segura*

GTP	Guanosina trifosfato
HEPES	Ácido (4-(2-hifroxietil)-1-piperazinaetanosulfônico
HSPs	*Heat shock proteins*
LMW	*Low molecular weight* – baixo peso molecular
LTDA	Limitada
MA	Enzima isolada do fungo *Myceliophtora termophila* + albumina
MC	Enzima isolada do fungo *Myceliophtora termophila* + caseína
MÊS	Ácido 2-(*N*-morfolino) etanosulfônico
MIF	Fator inibitório de migração de macrófago
MG	Enzima isolada do fungo *Myceliophtora termophila* + gelatina
MS	Enzima isolada do fungo *Myceliophtora termophila* + soro de leite
NCBI	*National Center for Biotechnology Information*
NK	Células natural killers
NOK	*Normal oral keratinocites* – Queratinócito oral normal
Otm	Ótimo
PDA	Ágar batata dextrose
PDB	Protein Data Bank
PLGS	*Protein Lynx Global Server*
PLS-DA	*Partial least squares discrimination*
PGK1	Fosfoglicerato quinase
PKM	Piruvato quinase
PMSF	Phenylmethylsulphonyl fluoride
PSI-KB	Protein Structure Initiative Knowledgebase
Resazurina	7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona 10-óxido
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro
RNAr	Ácido ribonucleico ribossômico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
SOD	Enzima superóxido dismutase
TA	Tripsina + albumina
TC	Tripsina + caseína
TCA	Ácido tricloroacético
TFA	Ácido trifluoroacético

TNBS	Ácido 2,4,6- trinitrobenzeno sulfônico
T-wave	*Traveling wave*
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
Triton	Triton X-100
Triton™X-100	4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl) phenyl-polyethylene glycol (4-(1,1,3,3 – Tetrametil-butil) fenil-polietileno glicol)
Trolox	(±)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid
TS	Tripsina + soro de leite
Tween	Tween® 20
Tween® 20	Polysorbato 20
UniProt	Universal Protein Resource
UPLC	*Ultra Performance Liquid Chromatography*

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
α	Alfa
β	Beta
°C	Graus Celsius
m/v	Massa/volume
v/v	Volume/volume
rpm	Rotações por minuto
mM	Mili molar
mL	Mililitro
µmol	Micro mol
mmol	Mili mol
nM	Nano molar
γ	Gama
Da	Dalton
Min	Minutos
mm^3	Milímetro cúbico
mg	Miligrama
cm^2	Centímetro quadrado
nm	Nanometro
µL	Microlitro
µM	Micromolar
pmol	Pico mol
λ_{ex}	Comprimento de onda de excitação
λ_{em}	Comprimento de onda de emissão
K_M	Constante de Michaelis-Menten
k_{cat}	Constante catalítica
k_{cat}/K_M	Constante específica/Eficiência catalítica
UAF	Unidade arbitrária de fluorescência
U	Unidade enzimática
kDa	Kilo Dalton

s	Segundos
$S_{(1-3)}$	Subsítio da região N-terminal
$S'_{(1-3)}$	Subsítio da região C-terminal
$P_{(1-3)}$	Posição no substrato da região N-terminal
$P'_{(1-3)}$	Posição no substrato da região C-terminal
UA	Unidade de atividade
mA	Mili Ampére
Vh	Volt hora
eV	Eletro volt
m/z	Massa/carga
®	Registrado
™	*Trade mark* – marca comercial
M	Molar
fmol	Fento mol

SUMÁRIO

RESUMO i
ABSTRACT ii
LISTA DE FIGURAS iii
LISTA DE TABELAS vi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS ix
LISTA DE SÍMBOLOS xiii
1. INTRODUÇÃO 01
1.1. Enzimas 01
1.2. Peptidases 01
1.2.1. Fontes das peptidases 02
1.2.1.1. Peptidases de origem animal 02
1.2.1.2. Peptidases de origem vegetal 03
1.2.1.3. Peptidases de origem microbiana 03
1.2.1.3.1. *Eupenicillium javanicum* 04
1.2.1.3.2. *Myceliophthora thermophila* 04
1.2.2. Produção de peptidases fúngicas por bioprocesso 05
1.2.3. Classificação das peptidases 06
1.2.3.1. Treonino peptidase 07
1.2.3.2. Cisteíno peptidase 07
1.2.3.3. Peptidase aspártica 07
1.2.3.4. Peptidase glutâmica 07
1.2.3.5. Serino peptidase 08
1.2.3.6. Metalopeptidase 08
1.2.4. Aplicação de peptidases 09
1.3. Peptídeos bioativos 09
1.3.1. Fontes de proteínas de peptídeos bioativos 10
1.3.2. Atividades biológicas 11
1.3.2.1. Atividade antimicrobiana 11
1.3.2.2. Atividade anti-hipertensiva 12
1.3.2.3. Atividade antioxidante 13
1.3.2.4. Atividade imunomodulatória 14
1.3.2.5. Atividade anticâncer 15
1.3.2.5.1. Proteômica: uma ferramenta para elucidar o metabolismo do câncer 16
2. OBJETIVO 17
2.1. Objetivos específicos 17
3. MATERIAIS E MÉTODO 18
3.1. Microrganismos e manutenção 18
3.2. Bioprocesso submerso 18
3.2.1. Preparo do inóculo dos fungos *Eupenicillium javanicum* e *Myceliophtora thermophila* 19
3.2.2. Condições de cultivo 19
3.3. Purificação 20
3.3.1. Enzima secretada pelo fungo *Eupenicillium javanicum* 20
3.3.1.1. Filtração tangencial 20
3.3.1.2. Etapas cromatográficas: exclusão de massa molecular 20
3.3.1.3. Etapas cromatográficas: troca iônica 21
3.3.2. Enzima secretada pelo fungo *Myceliophtora thermophila* 22
3.3.2.1. Etapas cromatográficas: troca iônica 22

3.3.2.2. Etapas cromatográficas: interação hidrofóbica **22**
3.3.3. Avaliação do grau de pureza e determinação da massa molecular da peptidase **23**
3.4. Avaliação da atividade proteolítica com substrato caseína **23**
3.5. Quantificação de proteínas totais **24**
3.6. Ensaios de caracterização bioquímica **25**
3.6.1. Substrato peptídico com supressão intramolecular de fluorescência FRET **25**
3.6.2. Condições de ensaio da reação enzimática na caracterização bioquímica funcional utilizando os substratos FRET **26**
3.6.2.1. Efeito de pH: pH ótimo e estabilidade **27**
3.6.2.2. Efeito de temperatura: temperatura ótima e estabilidade **27**
3.6.2.3. Efeito de sais na atividade proteolítica **28**
3.6.2.4. Efeito de inibidores na atividade proteolítica **29**
3.6.2.5. Efeito de surfactantes na atividade proteolítica **29**
3.6.2.6. Efeito da ureia, guanidina e ditiotreitol (DTT) na atividade proteolítica **30**
3.6.3. Determinação da concentração molar da enzima purificada **30**
3.7. Estudos de cinética enzimática com substrato peptídico sintético com supressão intramolecular de fluorescência **31**
3.8. Obtenção de peptídeos bioativos **33**
3.8.1. Substratos proteicos utilizados na geração de peptídeos bioativos **33**
3.8.2. Obtenção dos hidrolisados proteicos **33**
3.8.2.1. Albumina de ovo, caseína e soro de leite **33**
3.8.2.2. Gelatina ultra pura **34**
3.9. Determinação do grau de hidrólise dos substratos proteicos (albumina de ovo, caseína e soro de leite) **35**
3.10. Avaliação das atividades biológicas dos peptídeos produzidos por hidrólise enzimática **35**
3.10.1. Atividade antioxidante **35**
3.10.1.1. Atividade antioxidante: eliminação de radicais ácido 2,2 azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico (ABTS) **36**
3.10.1.2. Atividade antioxidante: ensaio de captura de radicais DPPH (2,2'-difenil-β-picrilhidrazil) **36**
3.10.1.3. Atividade antioxidante: ensaio de atividade quelante de metal **37**
3.10.1.4. Atividade antioxidante: ensaio de poder redutor **37**
3.10.2. Atividade inibitória de proliferação de células cancerígenas *in vitro* **38**
3.10.2.1. Ensaio de viabilidade celular com células orais (Cal27, NOK e GN) **38**
3.10.2.2. Ensaio de Viabilidade Celular com células de melanoma murino B16F10 (ATCC: CLR-6475) **39**
3.10.3. Atividade inibitória de proliferação de células cancerígenas em camundongos **40**
3.10.3.1. Camundongos machos da linhagem Balb/C nude **40**
3.10.3.2. Xenoenxerto de células tumorais Cal27 em camundongos Balb/C nude **40**
3.10.3.3. Tratamento intratumoral com hidrolisados proteicos **41**

3.11. Estudos das diferentes proteínas expressas nos tratamentos de inibição de células cancerígenas *in vitro* e *in vivo* 41
3.11.1. Cultivo das células das linhagens cancerígenas Cal27 e B16F10 para estudos proteômicos 42
3.11.1.1. Estudos proteômicos das células Cal27: preparo das amostras 42
3.11.1.1.1. Extração proteica 42
3.11.1.1.2. Quantificação das proteínas 43
3.11.1.1.3. Estudos proteômicos das células Cal27: eletroforese 2D - focalização isoelétrica 43
3.11.1.1.4. Estudos proteômicos das células Cal27: eletroforese 2D - eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS/PAGE) 44
3.11.1.1.4.1. Obtenção e análise de imagens dos géis bidimensionais 45
3.11.1.1.5. Digestão tríptica 45
3.11.1.1.6. Purificação das amostras 46
3.11.1.1.7. Espectrometria de massas (MALDI-TOF/TOF) 46
3.11.1.1.8. Determinação das sequências e análise funcional das proteínas identificadas 47
3.11.1.2. Estudos proteômicos das células B16F10 e tumores *in vivo* 47
3.11.1.2.1. Extração proteica 48
3.11.1.2.2. Quantificação das proteínas 49
3.11.1.2.3. Digestão triptica 49
3.11.1.2.4. Purificação das amostras 50
3.11.1.2.5. Espectrometria de massas (LC-MS^{E}) 50
3.11.1.2.6. Determinação das sequências e análise funcional das proteínas identificadas 52
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 52
4.1. *Eupenicillium javanicum*: bioprocesso em meio submerso 52
4.1.1. Purificação da enzima secretada pelo fungo *Eupenicillium javanicum* 53
4.1.2. Ensaios de caracterização bioquímica da enzima secretada pelo fungo *Eupenicillium javanicum* utilizando substrato FRET 56
4.1.2.1. Efeito de pH: pH ótimo e estabilidade 56
4.1.2.2. Efeito de temperatura: temperatura ótima e estabilidade 58
4.1.2.3. Efeito de sais na atividade proteolítica da enzima secretada pelo fungo *Eupenicillium javanicum* 61
4.1.2.4. Efeito de inibidores na atividade proteolítica da enzima secretada pelo fungo *Eupenicillium javanicum* 63
4.1.2.5. Efeito de surfactantes na atividade proteolítica da enzima secretada pelo fungo *Eupenicillium javanicum* 64
4.1.2.6. Efeito de uréia, guanidina e ditiotreitol (DTT) na atividade proteolítica da enzima secretada pelo fungo *Eupenicillium javanicum* 67
4.1.3. Estudos de cinética da enzima secretada pelo fungo *E. javanicum* utilizando substrato peptídico sintético com supressão intramolecular de fluorescência 69
4.2. *Myceliophthora thermophila*: Bioprocesso em meio submerso 77

4.2.1. Purificação da enzima secretada pelo fungo *Myceliophthora thermophila* 77
4.2.2. Ensaios de caracterização bioquímica da enzima secretada pelo fungo *Myceliophthora thermophila* utilizando substrato FRET 80
4.2.2.1. Efeito de pH: pH ótimo e estabilidade 80
4.2.2.2. Efeito de temperatura: temperatura ótima e estabilidade 82
4.2.2.3. Efeito de sais na atividade proteolítica da enzima secretada pelo fungo *Myceliophthora thermophila* 85
4.2.2.4. Efeito de inibidores na atividade proteolítica da enzima secretada pelo fungo *Myceliophthora thermophila* 87
4.2.2.5. Efeito de surfactantes na atividade proteolítica da enzima secretada pelo fungo *Myceliophthora thermophila* 87
4.2.2.6. Efeito de uréia, guanidina e ditiotreitol (DTT) na atividade proteolítica da enzima secretada pelo fungo *Myceliophthora thermophila* 89
4.2.3. Estudos de cinética da enzima secretada pelo fungo *M. thermophila* utilizando substrato peptídico sintético com supressão intramolecular de fluorescência 90
4.3. Determinação do grau de hidrólise dos substratos proteicos (albumina de ovo, caseína e soro de leite) 98
4.4. Avaliação das atividades biológicas dos peptídeos produzidos por hidrólise enzimática 102
4.4.1. Atividade antioxidante 102
4.4.1.1. Atividade antioxidante: ensaio de captura de radicais DPPH (2,2'-difenil-β-picrilhidrazil) e quelante de metal 103
4.4.2. Atividade inibitória de proliferação de células cancerígenas *in vitro* 110
4.4.2.1. Ensaio de viabilidade celular com células orais (Cal27, NOK, GN) 111
4.4.2.2. Ensaio de viabilidade celular com células de melanoma (B16F10) 114
4.4.3. Atividade inibitória de proliferação de células cancerígenas em camundongos 116
4.5. Estudo das diferentes proteínas expressas nos tratamentos de inibição de proliferação de células cancerígenas *in vitro* 118
4.5.1. Efeito do tratamento com peptídeos bioativos sobre a linhagem celular de carcinoma epidermóide Cal27 118
4.5.1.1. Proteínas com abundâncias reduzidas após o tratamento com peptídeos bioativos 123
4.5.1.1.1. Efeito do tratamento com peptídeos bioativos sobre proteínas do citoesqueleto 123
4.5.1.1.2. Efeito do tratamento com peptídeos bioativos sobre proteínas de choque térmico (*heat shock proteins* - HSP) 123
4.5.1.1.3. Efeito do tratamento com peptídeos bioativos sobre as proteínas anexina A1, calreticulina, proibitina e profilina 124
4.5.1.1.4. Efeito do tratamento com peptídeos bioativos sobre as proteínas gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e dissulfeto isomerase 126

4.5.1.2. Proteínas com abundâncias aumentadas após o tratamento com peptídeos bioativos **127**
4.5.1.2.1. Tratamento com peptídeos bioativos eleva concentração de enzimas do metabolismo energético **127**
4.5.2. Efeito do tratamento com peptídeos bioativos sobre linhagem celular de melanoma B16F10 **130**
4.5.2.1. Efeito do tratamento com peptídeos bioativos sobre as funções moleculares de células de melanoma B16F10 **131**
4.5.2.2. Efeito do tratamento com peptídeos bioativos sobre os processos biológicos de células de melanoma B16F10 **134**
4.6. Estudos das diferentes proteínas expressas nos tratamentos de inibição de proliferação de células cancerígenas Cal27 *in vivo* **141**
4.6.1. Efeito do tratamento com peptídeos bioativos sobre as funções moleculares de células Cal27 *in vivo* **141**
4.6.2. Efeito do tratamento com peptídeos sobre os processos biológicos de células Cal27 *in vivo* **144**
5. CONCLUSÕES **151**
6. REFERÊNCIAS **152**
APÊNDICES **169**

1. INTRODUÇÃO

1.1. Enzimas

A vida e manutenção de organismos dependem de uma orquestra de reações químicas, consequentemente, a natureza projetou catalisadores que aceleram essas reações, os quais são denominados de enzimas (COPELAND, 2000). Durante séculos estas enzimas foram utilizadas de forma empírica pelo homem em diferentes processos. Atualmente estas biomoléculas apresentam grande importância industrial devido as seguintes características, eficiência e rápida ação na presença de baixas concentrações de substrato, baixa toxicidade, alta especificidade pelo substrato e facilidade de parar a reação quando necessário (SANCHEZ; DEMAIN, 2011). Além destas vantagens, biocatalisadores estão disponíveis em recursos renováveis e apresentam seletividade quanto à estereoquímica do substrato e do produto, o que as tornam mais interessantes do que os catalisadores químicos (JEMLI et al., 2014).

1.2. Peptidases

As peptidases são também conhecidas como proteinases e proteases, porém é recomendado pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular o uso do termo “peptidase” (RAWLINGS; MORTON; BARRETT, 2007). Estas enzimas são distribuídas em diversos ambientes, devido a sua participação nos processos fisiológicos de diferentes organismos. Estas macromoléculas catalisam hidrólise de ligações formadas entre aminoácidos presentes em uma cadeia polipeptídica liberando aminoácidos e/ou

peptídeos, assim são pertencentes à classe das hidrolases (E.C. 3). (SRILAKSHMI et al., 2014).

Esta subclasse de enzima possui características que a torna destaque na utilização em indústrias. A versatilidade em atuar em amplas faixas de pH e temperatura e a capacidade de catalisar diferentes substratos, faz com que uma mesma subclasse de enzima conduza diferentes reações proteolíticas em um mesmo processo. Esta capacidade em atuar em diversas condições e substratos torna as peptidases uma ferramenta de grande importância na aplicação industrial, sendo 70 % das enzimas utilizadas. A maioria desta demanda é obtida a partir de fontes microbianas (fungos e bactérias) (SRILAKSHMI et al., 2014).

1.2.1. Fontes das peptidases

As peptidases podem ser obtidas de diferentes organismos, tais como, plantas, animais, bactérias, leveduras e fungos filamentosos (VELOORVALAPPIL et al., 2013).

1.2.1.1. Peptidases de origem animal

As peptidases animais mais conhecidas são a tripsina pancreática, quimotripsina, pepsina e renina. A tripsina é uma enzima intestinal responsável pela digestão de proteínas de alimentos. A quimotripsina é encontrada em extrato pancreático animal, e a sua obtenção isolada é de alto custo, assim é utilizada apenas em diagnósticos e aplicações analíticas. A pepsina é uma peptidase ácida encontrada no estomago da maioria dos vertebrados. A renina é uma peptidase pepsina-*like* e tem sido utilizada na indústria de laticínios na produção de coalhada (VELOORVALAPPIL et al., 2013).

1.2.1.2. Peptidases de origem vegetal

As peptidases de origem vegetais mais conhecidas são papaína e bromelina. A papaína é extraída do látex do mamão e é ativa entre os valores de pH 5 e 8. A bromelina é originada do abacaxi. O maior problema da produção de peptidases de origem vegetal é a disponibilidade de área de cultivo e as condições climáticas favoráveis. Além disso, os vegetais possuem baixa concentração destas enzimas, necessitando de grandes quantidades de vegetais para a produção da peptidase (VELOORVALAPPIL et al., 2013).

1.2.1.3. Peptidases de origem microbiana

As peptidases de origem microbiana (bactérias e fungos) são as mais utilizadas na produção em grande escala, devido ao rápido crescimento e maquinaria do organismo conhecida, característica que facilita a produção de novas enzimas recombinantes (RAO et al., 1998; CHANALIA et al., 2011).

Fungos filamentosos são utilizados em diversos processos industriais na produção de inúmeras macromoléculas. As peptidases de origem fúngica apresentam grande interesse nas pesquisas, devido à diversidade, a estabilidade em condições extremas, e oferece facilidade na sua recuperação no meio de cultura por simples filtração do micélio. Esta gama de enzimas produzidas está associada à distribuição cosmopolita dos fungos que exige a produção de diferentes macromoléculas para se adaptar (VELOORVALAPPIL et al., 2013).

De acordo com o habitat, os fungos são classificados como psicrófilos, mesofílicos e termofílicos, cada classe destas produzem diferentes enzimas com interesse

de aplicação comercial. Fungos termofílicos produzem peptidases termoestáveis e com atividade proteolítica em altas temperaturas de 65 – 85 ºC. Característica que permite a aplicação destas enzimas em diversos processos, principalmente aqueles que exigem alta temperatura na produção. As peptidases produzidas por fungos mesofilícos também são aplicados em diferentes tipos de indústria, sendo que os fungos do gênero *Aspergillus* são responsáveis por grande parte destas enzimas de origem fúngica (SRILAKSHMI et al., 2014).

1.2.1.3.1. *Eupenicillium javanicum*

O fungo filamentoso *Eupenicillium javanicum* é mesofílico e têm demonstrado potencial biotecnológico na produção de diferentes enzimas e metabólitos secundários com aplicação industrial. O microrganismo produz compostos com atividade antifúngica (NAKADATE et al., 2007; NAKADATE et al., 2008), endoglucanase, β-glicosidase, pectinase, xilanase (TAO et al., 2011), e proteases estáveis a processos de secagem por spray-dryer (HAMIN NETO et al., 2014).

1.2.1.3.2. *Myceliophthora thermophila*

Myceliophthora thermophila é um fungo filamentoso classificado como termofílico. Recentes estudos demonstram o potencial biotecnológico desta espécie na produção de diferentes enzimas por bioprocessos e por expressão heteróloga. Zerva, Christakopoulos e Topakas (2015) produziram uma peroxidase termofílica do fungo *Myceliophthora thermophila* em *Pichia pastoris*, aplicada na síntese de catecol. As enzimas β-manases do fungo *Myceliophthora thermophila* foram expressas em *Pichia*

pastoris, e demonstraram capacidade de degradar lignocelulose (KATSIMPOURAS et al., 2016). Kool e colaboradores relataram a produção de acetil esterase por *Myceliophthora thermophila* C1, a enzima foi capaz de desacetilar xantana (KOOL et al., 2014). A lacase comercial do fungo *Myceliophthora thermophila* foi utilizada na bioconversão de biomassa derivada de fenol (ZERVA et al., 2016).

1.2.2. Produção de peptidases fúngicas por bioprocesso

Além das características dos microrganismos, as condições de cultivo e os nutrientes presentes no meio influenciam nas quantidades e propriedades das macromoléculas produzidas. As peptidases podem ser produzidas em grandes quantidades e curto espaço de tempo por métodos estabelecidos de fermentação. De maneira geral estas peptidases são secretadas no meio de cultura, o que facilita a obtenção do produto isolado quando comparado com as outras fontes de peptidases. Além das enzimas extracelulares, utilizadas na obtenção de nutrientes que possam ser a absorvidos pelo organismo, existem as intracelulares que estão associadas aos processos metabólicos dos microrganismos (DE SOUZA et al., 2015).

A produção de peptidases por estes microrganismos pode ser realizada por dois tipos de bioprocessos, em meio líquido (submerso) e meio sólido. A produção de peptidases em cada bioprocesso depende das características físico-químicas do meio oferecido ao microrganismo (SANDHYA et al., 2005). O bioprocesso submerso facilita a extrapolação para escala industrial e devido a um maior controle das condições de cultivo, pH, temperatura e distribuição de nutrientes, parâmetros essenciais para o sucesso e otimização da obtenção destas peptidases (SINHA; SINHA, 2009).

Diante do histórico de potencial biotecnológico dos fungos *Eupenicillium javanicum* e *Myceliophthora thermophila*, e as características do bioprocesso em meio submerso, estes fungos filamentosos foram submetidos ao bioprocesso submerso para obtenção de peptidases.

1.2.3. Classificação das peptidases

Peptidases são classificadas como hidrolases (E.C. 3.4) e podem ser divididas de acordo com a posição do substrato na qual promove a clivagem, sendo que, peptidases que clivam próximo as regiões amino e carboxi terminal são denominadas de exopeptidases, e são subdivididas em carboxipeptidases e aminopeptidases. As peptidases que atuam distantes das extremidades da cadeia polipeptídica são denominadas endopeptidases (RAO et al., 1998).

As peptidases também são classificadas de acordo com o pH do meio reacional no qual apresentam maior atividade proteolítica. As peptidases que apresentam maior atividade proteolítica na faixa de pH 2 a 6 são classificadas como ácidas, aquelas que atuam melhor entre pH 6 e 8 são consideradas neutras e entre 8 e 10 são denominas peptidases alcalinas. As peptidases neutras apresentam máxima atividade em pH 7,0. Esta classificação facilita a seleção de uma enzima para as condições de determinado processo industrial, o que evita a perda na produção (SRILAKSHMI et al., 2015).

Em adição a estas classificações, existe aquela que melhor as caracterizam, a qual é baseada no tipo de resíduo de aminoácido principal do sítio catalítico. De acordo com esta classificação existem 6 grandes grupos, serino peptidases (E.C. 3.4.21), treonino peptidase (E.C. 3.4.25), cisteíno peptidase (E.C. 3.4.22) peptidase aspártica (E.C. 3.4.23), peptidase glutâmica (E.C. 3.4.19) e metalopeptidase (E.C. 3.4.24) (RAO et al., 1998).

1.2.3.1. Treonino peptidase

As peptidases pertencentes ao grupo das treonino peptidases apresentam importante papel na indústria, e são caracterizadas por um resíduo de treonina no sítio catalítico. Estas peptidases apresentam importância na fisiologia e no proteosomo, aciltransferases são exemplos clássicos (SRILAKSHMI et al., 2015).

1.2.3.2. Cisteíno peptidase

As peptidases classificadas como cisteino peptidases conduzem a catálise associada com um grupo tiol nucleófilo presente na díade ou tríade catalítica. Estas enzimas estão presentes em frutos, como mamão e abacaxi. Cisteíno peptidases podem ser aplicadas na indústria de aves e como amaciantes de carnes. Além disso, podem ser utilizadas como enzimas terapêuticas no controle de infecções virais (RAO et al., 1998).

1.2.3.3. Peptidase aspártica

As peptidases aspárticas são diferentes das outras classes e participam da manutenção de funções fisiológicas. Alguns exemplos são pepsina, catepsina, e renina. Este grupo apresenta atividade em pH ácido (RAO et al., 1998).

1.2.3.4. Peptidase glutâmica

Peptidases glutâmicas são encontradas em diversas espécies de fungos e são utilizadas no processamento de alimentos e como terapêuticos. A presença destas enzimas e como atuam na fisiologia de fungos ainda não é totalmente conhecida (SRILAKSHMI et al., 2015).

1.2.3.5. Serino peptidase

As serino peptidases são as enzimas que mais contribuem na aplicação industrial e terapêutica, este grupo se caracteriza por apresentarem resíduos de serina como aminoácidos nucleófilos. Alguns exemplos de enzimas comerciais são quimotripsina/tripsina e subtilisina. Devido ao seu amplo espectro de aplicação industrial e na medicina, muitas serino peptidases recombinantes foram produzidas e tronaram se de uso comercial. A variedade de enzimas produzidas influenciou no surgimento de novas famílias de serino peptidases, as quais se diferem por 2 ou 3 tipos de resíduos de aminoácidos no sítio catalítico (díade e tríade catalítica), e ao dobramento destes resíduos na estrutura da proteína. Existem 4 classes distintas e de grande importância comercial dentre estas famílias, tripsina-*like*, quimotripsina-*like*, elastase-*like* e subtilisina-*like* (SRILAKSHMI et al., 2015).

1.2.3.6. Metalopeptidase

Metalopeptidases caracterizam por o envolvimento de íons metálicos na catálise. Estas enzimas apresentam afinidade por diversos substratos e estão presentes em diferentes fontes, o que as capacitam de serem aplicadas em várias indústrias (SRILAKSHMI et al., 2015). O mecanismo de ação das metalopeptidases difere

das outras classes mencionadas. Estas enzimas são ativadas na presença de cátions bivalentes e são inativadas por diálise ou adição de agentes quelantes. O ataque nucleófilo é mediado por uma molécula de água, a qual é ativada na presença destes metais (RAO et al., 1998).

1.2.4. Aplicação de peptidases

Peptidases possuem especificidade para os mais diversos substratos, o que as tornam comercialmente aplicáveis em várias áreas, em indústria de alimentos, de medicamentos, em detergentes, no tratamento de couro, na biorremediação, na recuperação de prata em filmes de raio X (VISHWANATHA; RAO, 2010; RAI; MUKHERJEE, 2011) e, de forma especial, na produção de peptídeos bioativos por hidrólise enzimática de proteínas (KORHONEN, 2009; PHELAN et al., 2009).

Recentes estudos têm demonstrado o uso de enzimas microbianas na produção de peptídeos bioativos com a utilização de diferentes substratos proteicos. A peptidase produzida pela linhagem de *Bacillus sp.* P7 gerou peptídeos com atividades antimicrobiana, anti-hipertensiva e antioxidante a partir da hidrólise da caseína de ovinos (CORRÊA et al., 2011), e peptídeos com atividade anti-hipertensiva e antimicrobiana a partir da hidrólise de soro de queijo de ovelha (CORRÊA et al., 2014). Além disso, peptídeos foram obtidos da hidrólise de proteína de soja, por proteases de *Aspergillus oryzae* LBA01,e apresentaram atividade antioxidante (SATO, 2014).

1.3. Peptídeos bioativos

De maneira geral, peptídeos bioativos apresentam de 2 a 20 resíduos de aminoácidos e podem compor a cadeia polipeptídica de proteínas de alimentos. (ERDMANN; CHEUNG; SCHRÖDER, 2008). Estes fragmentos de proteínas apresentam atividade biológica após serem liberados da molécula de origem por hidrólise, que pode ser por enzimas digestivas, ação de peptidases ou fermentação microbiana (MOHANTY et al., 2015).

Além do valor nutricional, peptídeos bioativos modulam funções biológicas por interação com receptores específicos em células alvos, com isso promove resposta fisiológica benéfica no organismo (FITZGERALD; MURRAY, 2006).

Estudos sobre o potencial efeito benéfico de peptídeos bioativos em humanos têm sido conduzidos por serem uma alternativa de fonte natural às drogas sintéticas (NONGONIERMA; FITZGERALD, 2016). Estes peptídeos apresentam menor potência que drogas farmacêuticas, porém menor efeito colateral devido aos mecanismos metabólicos serem naturais (LI-CHAN; EUNICELI-CHAN, 2015).

1.3.1. Fontes de proteínas de peptídeos bioativos

As fontes de proteínas para a produção de peptídeos são selecionadas, de acordo com a presença de proteínas de valor agregado que são subutilizadas e em sequências de aminoácidos que apresentam interesse farmacológico (UDENIGWE; ALUKO, 2012).

Peptídeos bioativos têm sido produzidos a partir de proteínas de origem animal e vegetal (BHAT; KUMAR; BHAT, 2015). Entretanto, a maioria dos estudos são conduzidos com a utilização de proteínas de origem animal, com destaque ao leite, ovo e carne. Alguns pesquisadores também produziram estes peptídeos com a utilização de proteínas de peixes como substrato da peptidase (UDENIGWE; ALUKO, 2012).

Dentre as proteínas já utilizadas na obtenção de peptídeos bioativos, as derivadas de leite são consideradas uma das mais importantes, com destaque a caseína, disponível comercialmente em grande quantidade, alto grau de pureza e baixo custo, o que a torna um atrativo para a pesquisa de peptídeos bioativos (HAQUE; CHAND, 2008).

Outra fonte de origem animal de peptídeos muito importante são os ovos, que possuem em sua composição proteínas, lipídeos e várias substâncias biologicamente ativas. A necessidade da procura de novas substâncias encadeou vários estudos de caracterização das funções biofisiológicas, de componentes deste alimento. Com isso, atualmente, ovos têm sido considerados fontes de substâncias com significante potencial terapêutico (MINE, 2007).

As fontes vegetais de proteínas mais utilizadas na produção de peptídeos bioativos são soja, legumes (lentilha, grão de bico, ervilha e feijão), aveia, trigo e outros (UDENIGWE, ALUKO, 2012).

1.3.2. Atividades biológicas

A atividade biológica destes peptídeos podem diferir de acordo com a sequência de aminoácidos que são compostos (LEMES et al., 2016). Algumas das atividades relatadas são hipocolesterolêmica (MARQUES et al., 2015), antitrombótica, antioxidante (ZHENG et al., 2016), anti-hipertensiva (CIAN; VIOQUE; DRAGO, 2015), inibidora de dipeptidil peptidase IV (FONTOURA et al., 2014), antimicrobiana (RAHMAWATI, SUNTOMSUK, 2016), imunomodulatória (BONOMI et al., 2011), citomodulatória (PLAISANCIÉ et al., 2013) e antitumoral (OH et al., 2015).

1.3.2.1. Atividade antimicrobiana

A necessidade da descoberta de novas substâncias antimicrobianas é devido ao progressivo desenvolvimento de resistência de microrganismos patogênicos contra os antibióticos convencionais (KIM; WIJESEKARA, 2010). A resistência a antibióticos é preocupante devido estar relacionada à alta taxa de mortes em todo o mundo com predição de 10 milhões em 2050, quantidade superior às mortes relacionadas com os diversos tipos de câncer (O'NEILL, 2014). Diante deste cenário, os peptídeos antimicrobianos (AMPs) surgem como alternativa de agente terapêutico aos antibióticos convencionais (CRUZ et al., 2014).

Os AMPs são pequenas moléculas orgânicas, geralmente são carregadas positivamente e apresenta um amplo espectro de atividade contra bactérias, fungos, protozoários e alguns vírus (WANG; WU; LIU et al., 2016). Diferente dos antibióticos convencionais, os quais possuem um alvo definido de alta afinidade, o que pode levar a resistência dos microrganismos, os AMPs exercem atividade antimicrobiana com estratégias que previnem esta resistência (PESCHEL; SAHL, 2006).

1.3.2.2. Atividade anti-hipertensiva

A hipertensão afeta cerca de um quarto da população mundial sendo o maior fator de risco para doenças cardiovasculares e complicações relacionadas (HARTMANN; MEISEL, 2007; FITZGERALD; MURRAY, 2006).

A enzima conversora de angiotensina-I (ECA) catalisa a conversão de angiotensina-I em angiotensina-II, um potente vasoconstritor, e apresenta importante função na regulação da pressão arterial em mamíferos e no balanço de sais (HARTMANN; MEISEL, 2007).

Esta enzima diminui o nível do peptídeo vasoconstritor, angiotensina-II, e um aumento no nível do peptídeo vasodilatador, bradicinina, resultando na redução da pressão arterial (FITZGERALD; MURRAY, 2006).

Desde a primeira descoberta de inibidores dessa enzima, um grande número de peptídeos inibidores de ECA tem sido isolado a partir da digestão de proteínas de alimentos, especialmente de leite (HARTMANN; MEISEL, 2007).

As casocininas e lactocininas representam um grupo de peptídeos bioativos que apresentam significante potencial como agentes para o controle de pressão arterial e doenças relacionadas (FITZGERALD; MEISEL, 2000).

1.3.2.3. Atividade antioxidante

Oxidação é um processo vital em todos os seres vivos, no qual radicais livres são produzidos e podem causar danos ao organismo. Oxidação é um balanço dinâmico entre produção e eliminação de radicais livres, e quando em excesso podem levar ao envelhecimento humano e muitas doenças (LI; YU, 2015).

Antioxidante é uma substância que diminui os efeitos adversos das espécies reativas, como oxigênio e nitrogênio. Atualmente, estas substâncias são produzidas por síntese química (LI; YU, 2015). Antioxidantes artificiais como butilhidroxiacetona e butilhidroxitolueno apresentam potencial contra vários sistemas oxidantes, entretanto, podem ser prejudiciais (PHELAN et al., 2009). Devido aos efeitos adversos destes antioxidantes, há uma busca por antioxidantes de origem natural (LI; YU, 2015).

Antioxidantes naturais são importantes na prevenção de doenças em humanos e na inibição da oxidação de lipídeos em alimentos (DI BERNADINI et al., 2011). Propriedades antioxidantes que previnem a ação enzimática da lipoxigenase e não

enzimática da peroxidação de ácidos graxos essenciais tem sido encontrada em peptídeos derivados de proteínas do leite (HARTMANN; MEISEL, 2007).

Em 1991 foi relatado a primeira utilização de alguns peptídeos e hidrolisados proteicos na redução da taxa de auto-oxidação e peróxido em gordura (PROKORNY, 1991), em seguida, muitas pesquisas foram realizadas buscando peptídeos com alta atividade oxidante (LI; YU, 2015).

1.3.2.4. Atividade imunomodulatória

O sistema imune é responsável pela defesa do indivíduo contra agentes extrínsecos e/ou intrínsecos, por meio de moléculas, células e tecidos que formam as imunidades inata e adquirida. A imunidade inata ou natural compreende na primeira linha defesa disponível no organismo assim que há o contato com o agente causador da doença. A imunidade adquirida ou adaptativa é caracterizada por defender o organismo de forma específica e complexa gerando uma memória imunológica. Neste contexto, a ação de ambos os sistemas é determinada como resposta imune (ABBAS; LICHTMAN, 2007; KRENSKY; BENETTI; VINCENTI, 2011).

Os principais provocadores desta resposta são os agentes infecciosos (vírus, bactérias, fungos e parasitas), tanto no combate quanto na imunização através de vacinas, bem como alérgenos, tumores, transplantes e ao próprio organismo nas doenças autoimunes (ABBAS; LICHTMAN, 2007; KRENSKY; BENETTI; VINCENTI, 2011).

Desta forma, percebeu-se a necessidade e o amplo campo de atuação para o desenvolvimento de fármacos cujo alvo seria a modulação da resposta imunológica visando o tratamento de tais patologias (CASSATELLA; PERRETTI, 2006).

A imunomodulação consiste em uma abordagem terapêutica a fim de suprimir ou estimular a resposta imune de acordo à necessidade (RICCARDI; MIGLIORATI, 2015).

Os agentes terapêuticos responsáveis por modular a resposta imune têm diversas origens e seguem diferentes mecanismos. Uma importante fonte de imunomoduladores são os peptídeos bioativos. Peptídeos de baixa massa molecular e carregado positivamente podem ter um papel chave no estímulo da resposta imune (KONG; GUO; HUA, 2008). Diferentes relatos mostram que os peptídeos imunomoduladores são capazes de modificar a resposta do sistema imune inato e/ou adquirido, como a diminuição ou aumento da proliferação de linfócitos, aumento da atividade de células natural killers (NK), síntese de anticorpos, aumento de fagocitose e regulação de citocinas (MEISEL, 1997; GILL et al., 2000; SUN; JENSSEN, 2012). Porém os mecanismos de ação não são bem descritos, pois são relativamente não específicos e também devido à falta de informações quanto à caracterização estrutural destas moléculas (AGYEI; DANQUAH, 2012; REYES-DÍAZ et al., 2016).

1.3.2.5. Atividade anticâncer

O Câncer é uma doença responsável pelos maiores índices de morbidade e mortalidade em todo o mundo. A ocorrência do câncer é relacionada com vários fatores, entre eles, ambientais, nutricionais, genéticos, infecções virais e estilo de vida. Esta doença é dividida em três diferentes estágios incluindo iniciação, promoção e progressão, os quais estão relacionados com uma variedade de mecanismos complexos, ativação da oncogênese, inativação de genes supressores do câncer, e interação entre estes (LI; YU, 2015).

Nas últimas décadas, existiram muitos progressos em relação ao tratamento do câncer, sendo que a quimioterapia prevalece como tratamento usual para a doença avançada. Por outro lado, estes agentes quimioterápicos apresentam como alvo células cancerígenas que dividem rapidamente, porém podem destruir células e tecidos normais o que causa efeitos adversos. Mediante a isto, é necessário pesquisas e desenvolvimentos de fármacos com maior eficácia e menores efeitos colaterais. Peptídeos que possuem atividade anticâncer podem ser uma alternativa aos agentes quimioterápicos, estes fragmentos de proteínas de alimentos apresentam menor toxicidade, e em sua maioria são caracterizados por serem pequenas moléculas e catiônicas, sendo que sua interação eletrostática com a membrana celular aniônica pode estar relacionada com a seletividade à morte de células cancerígenas. Alguns pesquisadores sugerem que esta atividade anticâncer deve se a formação de canais de íons na membrana celular. A relação estrutura atividade e o mecanismo preciso ainda não são totalmente elucidados (LI; YU, 2015).

1.3.2.5.1. Proteômica: uma ferramenta para elucidar o metabolismo do câncer

O aumento do conhecimento da complexidade e heterogeneidade do câncer, evidenciou que esta patologia envolve múltiplas vias metabólicas, e é resultado de variedade genética, molecular e clínica. A transformação maligna envolve mudanças em expressões proteicas, o que influencia o circuito molecular destas células, com isso, a análise proteica é uma estratégia para caracterizar redes funcionais e regulatórias, para identificar interações e modificações proteicas (ZHOU; LIOTTA; PETRICOIN, 2015).

A espectrometria de massas é uma das ferramentas utilizadas para identificar uma grande quantidade de proteínas e comparar os diferentes níveis de expressão em várias amostras, facilitando a compreensão dos mecanismos cancerígenos (MAES et al., 2015).

2. OBJETIVO

Este projeto teve como objetivo primordial gerar peptídeos com possível atividade biológica, com a utilização de substratos proteicos e peptidases isoladas dos fungos filamentosos *Eupenicillium javanicum* e *Myceliophthora thermophila*.

2.1. Objetivos específicos

- Produzir e purificar peptidases do extrato do bioprocesso submerso dos fungos *Eupenicillium javanicum* e *Myceliophthora thermophila*.
- Realizar ensaios de caracterização bioquímica e cinética enzimática utilizando como substrato o peptídeo sintético de fluorescência apagada FRET.
- Utilizar estas peptidases na obtenção de peptídeos a partir de albumina de ovo, caseína e soro de leite.
- Realizar ensaios de atividade biológica in vitro com estes peptídeos (antioxidante e inibitória de células cancerígenas).
- Realizar ensaios de atividade de inibição de proliferação de células cancerígenas in vivo.
- Realizar ensaios proteômicos de atividade de inibição de proliferação de céluas in vitro e in vivo.

A Figura 1 representa um panorama geral com todas as etapas deste estudo até alcançar o objetivo geral.

Figura 1. Panorama geral de todas as etapas realizadas no estudo, desde a produção das peptidases até a aplicação na produção de peptídeos, seguido da avaliação de atividade biológica.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Microrganismos e manutenção

Os fungos *Eupenicillium javanicum* e *Myceliophtora thermophila* pertencem à coleção de microrganismos do laboratório de Tecnologia Enzimática da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Hamilton Cabral. Os fungos são mantidos em tubos de ensaio, contendo o meio agar batata (*Myceliophtora thermophila*) e meio sabouraud (*Eupenicillium javanicum*), armazenados a 4 °C.

3.2. Bioprocesso submerso

3.2.1. Preparo do inóculo dos fungos *Eupenicillium javanicum* e *Myceliophtora thermophila*

A produção de peptidases pelos fungos *E. javanicum* e *M. thermophila* foram realizadas com inóculo de suspensão de material fúngico. Para isso, os fungos cresceram durante 7 dias, a 30 ºC e 45 ºC, em meios agar batata e sabouraud, *E. javanicum e M. thermophila*, respectivamente. Após este tempo de crescimento, a superfície dos meios de cultura foram raspadas na presença de água ultra pura com espátula estéril em cabine de segurança biológica classe 2. As suspensões obtidas foram reunidas em uma única alíquota para cada fungo, e 1 mL dessas suspensões foram os inóculos utilizado para cada bioprocesso submerso (MERHEB et al., 2007).

3.2.2. Condições de cultivo

A produção de peptidases foi conduzida em bioprocesso submerso em erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL de meio de cultura, KH_2PO_4, 0,7 % (m/v); K_2HPO_4, 0,2 % (m/v); $MgSO_4.7H_2O$, 0,01 % (m/v); NaCl, 0,5 % (m/v); extrato de levedura, 0,1 % (m/v); caseína, 0,5 % (m/v); peptona, 0,5 % (m/v) e $CaCl_2.2H_2O$ 0,1 % (m/v); modificado de Tran e Nagano (2002). Após o preparo, o pH do meio foi corrigido com HCl 1 M para 5,0 e autoclavado a 121 °C por 15 min. Após o meio atingir a temperatura ambiente, foi inoculado 1 mL da suspensão de material fúngico.

O bioprocesso foi realizado em 144 horas, a 30 ºC para *Eupenicillium javanicum* (HAMIN NETO; MOTTA; CABRAL, 2013), e 48 horas, a 45 ºC para *Myceliophtora thermophila* (HAMIN NETO et al., 2015), a 120 rpm. Em seguida, o material foi filtrado

em papel de filtro Whatman n°1. O filtrado foi submetido a um ensaio de atividade proteolítica (item 3.4.) e após certificação da produção de peptidases foi denominado como extrato enzimático bruto (EB).

3.3. Purificação

A caracterização de enzimas exige que estas estejam isoladas do meio de cultura inicial, desta forma as informações obtidas nos ensaios serão exclusivamente da proteína estudada. Existem muitos processos cromatográficos utilizados na obtenção da enzima em sua forma homogênea, os métodos utilizados dependem das características de interação da enzima e do meio que está presente. Desta forma para cada enzima foram utilizados diferentes processos que serão descritos posteriormente.

3.3.1. Enzima secretada pelo fungo *Eupenicillium javanicum*

3.3.1.1. Filtração tangencial

O extrato produzido pelo fungo *Eupenicillium javanicum* foi concentrado por filtração tangencial com membrana de 10 kDa, em sistema FlexStand™ (GE Healthcare). O produto da filtração tangencial foi separado em alíquotas, armazenadas a – 80 ºC. Conforme a necessidade as alíquotas foram descongeladas e submetidas aos processos cromatográficos.

3.3.1.2. Etapas cromatográficas: exclusão de massa molecular

A primeira etapa cromatográfica utilizada foi exclusão por massa molecular em resina Superdex 75 em coluna XK (26/100). A resina foi previamente equilibrada com 5 volumes de coluna de tampão tris-HCl 50 mM pH 8,0 + 150 mM de NaCl, em seguida 3 mL de extrato enzimático concentrado foram aplicados na resina, a eluição foi com o mesmo tampão de equilíbrio. A vazão da coluna foi ajustado para 0,62 $mL.min^{-1}$ com o auxílio de uma bomba peristáltica (GE Healthcare), frações de 5 mL foram coletadas em tubos de ensaio com o auxílio de um coletor de frações (GE Healthcare).

As frações eluidas foram ensaiadas para a atividade proteolítica e proteínas totais para determinar o perfil enzimático e protéico de eluição, as leituras foram em 280 nm em espectrofotômetro, Genesys 10S (Thermo).

3.3.1.3. Etapas cromatográficas: troca iônica

As frações coletadas da etapa anterior que apresentaram atividade proteolítica foram submetidas à diálise em tampão tris-HCl 50 mM, em membrana de celulose de 12 kDa, com três trocas de tampão durante 24 horas a 4 ºC. O objetivo da diálise for remover o sal e adequar o pH da amostra para a próxima etapa.

A amostra dialisada foi posteriormente purificada em resina aniônica Source 15Q (GE Healthcare) em coluna tricorn (5/50). Para isso, a resina foi equilibrada com 5 volumes de coluna com tampão tris-HCl 50 mM, pH 8,0, em seguida, 5 mL de amostra foram aplicados e realizado uma lavagem da resina com 2 volumes de coluna com o mesmo tampão de equilíbrio. Após a lavagem, o gradiente salino linear foi iniciado, com concentração crescente de 0 a 100 mM de cloreto de sódio, em 20 volumes de coluna. A vazão da coluna foi ajustada para 0,3 $mL.min^{-1}$ e frações de 1 mL foram coletadas em tubos de ensaio utilizando coletor de frações (GE Healthcare). O equipamento utilizado

foi o cromatógrafo ÄKTA purifier (GE Healthcare). Nas frações coletadas foram realizadas as atividades proteolíticas para avaliar perfil enzimático, o perfil proteico foi avaliado em 280 nm com auxílio do *software* Unicorn 5.20.

3.3.2. Enzima secretada pelo fungo *Myceliophtora thermophila*

3.3.2.1. Etapas cromatográficas: troca iônica

O extrato enzimático produzido pelo fungo *Myceliophthora thermophila* foi submetido a uma diálise em membrana com porosidade de 12 kDa por um período de 24 horas com três trocas de tampão tris-HCl 50 mM pH 8,0, a 4 ºC.

Após a adequação da amostra para a interação em cromatografia de troca iônica, foi iniciado o processo de purificação, em resina aniônica Source 15Q empacatodas em coluna tricorn (5/50).

A resina foi equilibrada com 5 volumes de coluna de tampão tris-HCl 50 mM, pH 8,0, 10 mL da amostra foram aplicados, em seguida, procedeu se a lavagem com 2 volumes de coluna de tampão de equilíbrio, e o gradiente linear utilizado foi de 0 a 150 mM de cloreto de sódio em tampão de equilíbrio, e 20 volumes de coluna. A vazão da coluna foi ajustada para 0,3 mL/min e frações de 1 mL foram coletadas em tubos de ensaio utilizando coletor de frações, o equipamento utilizado foi o cromatógrafo ÄKTA purifier.

Ensaios de atividade proteolítica avaliaram o perfil enzimático da eluição da peptidase, e o perfil protéico em 280 nm com o auxílio do *software* Unicorn 5.20.

3.3.2.2. Etapas cromatográficas: interação hidrofóbica

As frações que apresentaram atividade proteolítica foram reunidas e submetidas à cromatografia de interação hidrofóbica com resina Fenil Sepharose (GE Healthcare) em coluna tricorn (5/50).

A resina foi previamente equilibrada com 5 volumes de coluna de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0, com 750 mM de sulfato de amônio. Em seguida, amostra foi salinizada com a mesma concentração do tampão de equilíbrio e aplicada na resina, a resina foi lavada com 3 volumes de coluna com o tampão de equilíbrio, após a lavagem, iniciou se o gradiente de dessalinização com 20 volumes de coluna de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0. A vazão da coluna foi ajustada para 0,3 mL/min e frações de 1 mL foram coletadas em tubos de ensaio utilizando coletor de frações acoplado ao cromatógrafo ÄKTA purifier. Nas frações coletadas foram realizadas as atividades proteolíticas para avaliar perfil enzimático, e o perfil protéico foi avaliado pelo *software* Unicorn 5.20.

3.3.3. Avaliação do grau de pureza e determinação da massa molecular da peptidase

A pureza das peptidases foi certificada por gel de eletroforese desnaturante (SDS-PAGE) 12 %, segundo Laemmli, (1970) e coradas com nitrato de prata (SEE; JACKOWSKI, 1989). Os tamanhos das peptidases foram estimados pelo *software* ImageLab™ version 3.0.

3.4. Avaliação da atividade proteolítica com substrato caseína

As atividades proteolíticas utilizando substrato proteico caseína foram avaliadas em bioprocesso submerso para verificar a produção de peptidases pelos fungos *Eupenicillium javanicum* e *Myceliophtora thermophila*, e durante as etapas de purificação. O protocolo seguido foi descrito por Sarath et al. (1996) com algumas modificações. Foi utilizado 1 mL de caseína a 1 % (m/v), preparada em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6,5, + 100 µL de tampão fosfato 50 mM pH 6,5 + 100 µL de cada solução de enzima. A mistura reacional foi incubada por 30 min a 50 °C. Depois de percorrido o tempo de reação foi adicionado 600 µL de ácido tricloroacético (TCA) 10 % (m/v) para interromper a reação, os tubos testes centrifugados por 15 min a 10.000 x *g* a 25 °C, o ensaio nos tubos brancos ocorreu da mesma maneira, porém a enzima foi previamente desnaturada pela adição de TCA. Os sobrenadantes dos tubos testes foram lidos contra seus respectivos brancos, em cubeta de quartzo, no comprimento de onda 280 nm, em espectrofotômetro.

Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima requerida para promover o aumento de 0,001 A_{280nm} dentro das condições de reações usando caseína como substrato (GUPTA et al., 2002).

3.5. Quantificação de proteínas totais

A quantificação de proteínas totais foi utilizada em todos os passos cromatográficos dos extratos produzidos por ambos os fungos, o objetivo desta dosagem é avaliar a atividade especifica da enzima em cada etapa de purificação, consequentemente, a taxa de purificação da enzima. A quantificação foi avaliada conforme descrito por Bradford, utilizando curva padrão com soro albumina bovino (BSA) (BRADFORD, 1976).

3.6. Ensaios de caracterização bioquímica

3.6.1. Substrato peptídico com supressão intramolecular de fluorescência FRET

A caracterização bioquímica funcional das peptidases isoladas dos extratos fermentados dos fungos *Eupenicillium javanicum* e *Myceliophtora thermophila* foi conduzida utilizando substrato peptídico com supressão intramolecular de fluorescência. Esse substrato possui em cada extremidade um grupo molecular, onde na região amino-terminal está presente o ácido orto-aminobenzóico (Abz), responsável pela emissão da fluorescência da molécula, e na região carboxi-terminal, encontra-se o grupo etilenodiamo-dinitro-fenil (EDDnp), grupo responsável pela supressão da fluorescência (CHAGAS; JULIANO; PRADO, 1991).

O substrato funciona da seguinte maneira, enquanto intacto, ou seja, com as extremidades Abz e EDDnp próximas, o grupo EDDnp promove a supressão da fluorescência emitida pelo grupo Abz. Após a ação da peptidase sobre o substrato, ocorre a hidrólise do substrato e distanciamento entre os grupos Abz e EDDnp, consequentemente o aumento da florescência (SANTOS, 2009), Figura 2.

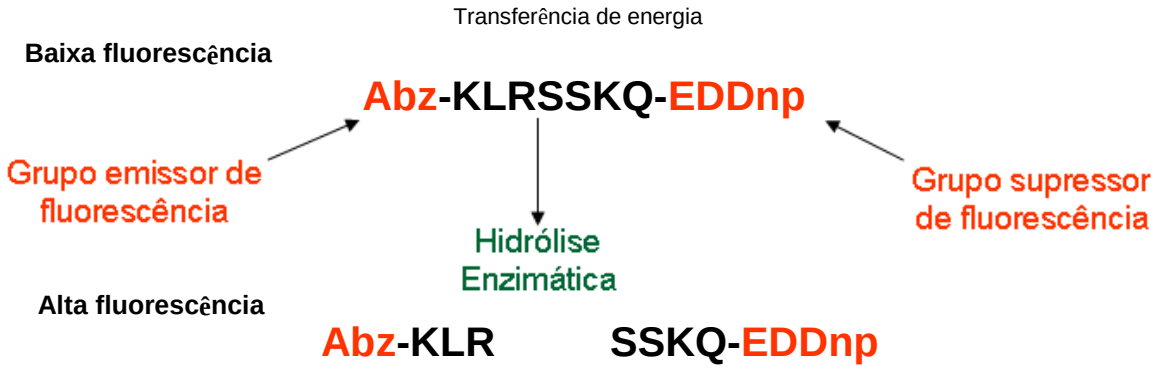

Figura 2. Esquema da funcionalidade do substrato peptídico com supressão intramolecular de fluorescência demonstrando as diferenças de fluorescência na forma íntegra (intacta) do substrato e na forma hidrolisada por ação enzimática (SANTOS, 2009).

Os Substratos peptídicos FRET foram produzidos em um sintetizador automático de peptídeos em fase sólida (Shimadzu Model PSSM-8), e purificados em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em coluna semi preparativa. A massa molecular e pureza dos substratos foram determinadas por espectrometria de massas MALDI-TOF, Microflex LT (BruckerDaltonics) (HIRATA et al., 1995). Os substratos foram ressuspendidos em DMSO, e a concentração foi determinada com o coeficiente de extinção molar 365 nm = 17300 $M^{-1}cm^{-1}$ em espectrofotômetro. A ligação cindível de peptídeos hidrolisados foi identificada pelo isolamento de fragmentos utilizando CLAE analítica, seguida por determinação da sua massa molecular por LCMS- 2010 equipado com uma sonda de ESI - (Shimadzu , Tóquio , Japão) (OLIVEIRA et al., 2015).

3.6.2. Condições de ensaio da reação enzimática na caracterização bioquímica funcional utilizando os substratos FRET

A reação enzimática foi realizada em espectrofluorímetro modelo Lumina fluorescence spectrometer (Thermo scientific) acoplado com sistema Peltier 4-Position

Fluorescense Cell Holder, que controla a agitação e temperatura. As reações ocorreram no interior de cubetas de quartzo com caminho ótico de 10 mm. Os comprimentos de ondas foram ajustados para λ_{ex}: 320nm e λ_{em}: 420nm. O *software* utilizado foi o Luminous Software version 3.0. A concentração final do substrato e enzima foram 0,48 mM e 5,8 x 10^{-4} mM (enzima *E. javanicum*) e 2,9 x 10^{-4} mM e 5 x 10^{-6} mM (enzima *M. Thermophila*), em todos os experimentos.

3.6.2.1. Efeito de pH: pH ótimo e estabilidade

O pH ótimo aparente das peptidases foi determinado pela quantidade de fluorescência emitida pelo substrato após reação com a enzima em diferentes valores de pH, de 4,5 a 9,0 com incrementos de 0,5 unidades de pH. Os sais utilizados para o preparo dos tampões foram acetato (pH 4,5 – 5,0); MES (pH 5,5 – 6,5); HEPES (pH 7,0 – 8,0) e BICINE (8,5 – 9,0), todos a 100 mM. A atividade relativa foi calculada em relação ao maior valor de atividade obtido.

A estabilidade das peptidases expostas a variação de pH foi avaliada por incubação da enzima durante 60 minutos a 25 °C nas faixas de pH (4,0-10,5) variando 0,5 unidade de pH. Após exposição, a reação foi conduzida em tampão MES 100 mM, em pH 6,0 (enzima *E. javanicum*), e em pH 6,5 (enzima *M. thermophila*), ambos a 45 ºC. A atividade relativa foi calculada em relação a atividade enzimática da enzima sem incubação nos diferentes valores de pH.

3.6.2.2. Efeito de temperatura: temperatura ótima e estabilidade

Uma vez definido o valor de pH ótimo aparente, a temperatura ótima aparente foi determinada entre 30 e 80 °C, com incrementos de 5 °C, quantificando a fluorescência obtida após a reação da enzima com o substrato peptídico. A reação foi conduzida em pH 6,0 (enzima *E. javanicum*), e em pH 6,5 (enzima *M. thermophila*). A atividade relativa foi calculada em relação ao maior valor de atividade obtido.

A estabilidade térmica foi avaliada com a exposição da enzima em diferentes temperaturas e tempos de incubação da enzima pura durante 5, 15, 30 e 60 minutos nas faixas de temperaturas de 30 a 60 ºC, com incrementos de 5 ºC. Após incubação, a reação enzimática foi realizada em pH 6,0 a 55 ºC (enzima *E. javanicum*) e em pH 6,5 a 45 ºC (enzima *M. thermophila*).

A atividade relativa foi calculada em relação a atividade enzimática da enzima sem incubação prévia nas diferentes temperaturas.

3.6.2.3. Efeito de sais na atividade proteolítica

A influência de sais sobre a atividade das peptidases foi avaliada, na presença dos seguintes sais, NaCl, LiCl, KCl, $MnCl_2$, $CoCl_2$, $CuCl_2$, $CaCl_2$, $MgCl_2$, $BaCl_2$, $AlCl_3$, $ZnSO_4$ e $NiSO_4$, 100 mM (concentração estoque).

Em cada tubo de reação foi adicionado enzima pura e solução de cada sal, obtendo concentração final de 5 mM dos íons. Os tubos foram incubados durante 5 minutos a 55 °C (enzima *E. javanicum*) e 45 ºC (enzima *M. thermophila*). Além disso, a atividade proteolítica foi realizada utilizando o substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp em tampão MES 100 mM, em pH 6,0 a 55 ºC (enzima *E. javanicum*) e em pH 6,5 a 45 ºC (enzima *M. thermophila*).

A atividade relativa foi calculada comparando com um controle pré-incubado com água.

3.6.2.4. Efeito de inibidores na atividade proteolítica

É possível classificar as peptidases de acordo com o mecanismo de inibição dessas enzimas. Os inibidores testados foram PMSF, EDTA, ácido Iodoacético (AIA) a 100 mM (estoque), segundo protocolo já descrito (DUNN, 1989). Os tubos foram incubados durante 5 minutos a 55 °C (enzima *E. javanicum*) e 45 ºC (enzima *M. thermophila*), com concentração final de 5 mM dos inibidores. Em seguida, a atividade proteolítica foi quantificada com substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp em tampão MES 100 mM, em pH 6,0 a 55 ºC (enzima *E. javanicum*) e em pH 6,5 a 45 ºC (enzima *M. thermophila*).

A atividade relativa foi calculada comparando com um controle pré incubado com água.

3.6.2.5. Efeito de surfactantes na atividade proteolítica

Para determinar os efeitos de surfactantes sobre a atividade proteolítica das peptidases purificadas, soluções de dodecil-sulfato de sódio (SDS), brometo de cetiltrimetilamónio (CTAB), Triton ™ X- 100 (triton), e Tween ® 20 (tween), 10 % (estoque), foram preparadas.

Em cada tubo de reação foi adicionado solução de enzima pura e cada surfactante, com uma concentração final de 0,1, 0,2, 0,5 ou 1,0 % de CTAB, triton ou tween e 0,1 , 0,08 , 0,06, 0,04 ou 0,02 de SDS, para a enzima do fungo *M. thermophila* e com uma concentração final de 0,1, 0,2, 0,5 ou 1,0 % de triton ou tween e 0,1 , 0,08 , 0,06, 0,04 ou

0,02 de CTAB ou SDS, para a enzima do fungo *E.javanicum*. Os tubos foram incubados durante 5 minutos a 55 °C (enzima *E. javanicum*) e 45 ºC (enzima *M. thermophila*). A atividade proteolítica foi determinada utilizando o substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp em tampão MES 100 mM, em pH 6,0 a 55 ºC (enzima *E. javanicum*) e em pH 6,5 a 45 ºC (enzima *M. thermophila*).

A atividade relativa foi calculada comparando com um controle pré incubado com água.

3.6.2.6. Efeito da ureia, guanidina e ditiotreitol (DTT) na atividade proteolítica

Para determinar os efeitos dessas substâncias na atividade proteolítica das peptidases, foram preparadas soluções de 1 M de ureia, guanidina e DTT 1 M.

Em cada tubo de reação foi adicionado enzima e cada substância, com uma concentração final de 10, 25, 50, 100 ou 150 mM de ureia , guanidina ou DTT, para a enzima do fungo *M. thermophila* foi testada até a concentração de 200 mM de DTT.

Os tubos foram incubados durante 5 minutos a 55 °C (enzima *E. javanicum*) e 45 ºC (enzima *M. thermophila*). A atividade proteolítica foi determinada com substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp em tampão MES 100 mM, em pH 6,0 a 55 ºC (enzima *E. javanicum*) e em pH 6,5 a 45 ºC (enzima *M. thermophila*).

A atividade relativa foi calculada em comparação ao controle previamente incubado com água.

3.6.3. Determinação da concentração molar da enzima purificada

A concentração molar das peptidases foi determinada por titulação do sítio ativo com o inibidor quimostatina, para a serino peptidase obtida do fungo *Myceliophtora thermophila*, e com EDTA para a metalopeptidase obtida do fungo *Eupenicillium javanicum*, conforme descrito por Klemencic et al. (2000) com modificações. A concentração da peptidase com substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp, em tampão MES 100 mM, pH 6,0 a 55 ºC (enzima *E. javanicum*) e em pH 6,5 a 45 ºC (enzima *M. thermophila*) em 714 nM pela leitura em espectrofluorimetro. Os comprimentos de onda de fluorescência foram ajustados para λ_{ex}: 320 nm e λ_{em}: 420 nm.

3.7. Estudos de cinética enzimática com substrato peptídico sintético com supressão intramolecular de fluorescência

A Figura 3 mostra o modelo sugerido por Schechter e Berger, (1967) no qual o sítio catalítico da enzima é dividido em subsítios denominados S_3, S_2, S_1, $S_{1'}$, $S_{2'}$ e $S_{3'}$, sendo que, cada subsítio possui um resíduo de aminoácido correspondente no substrato. Modificações em uma determinada posição no substrato, fixando as outras, nos permite avaliar qual aminoácido interage melhor com cada subsítio, desta forma propiciando uma melhor eficiência catalítica da enzima.

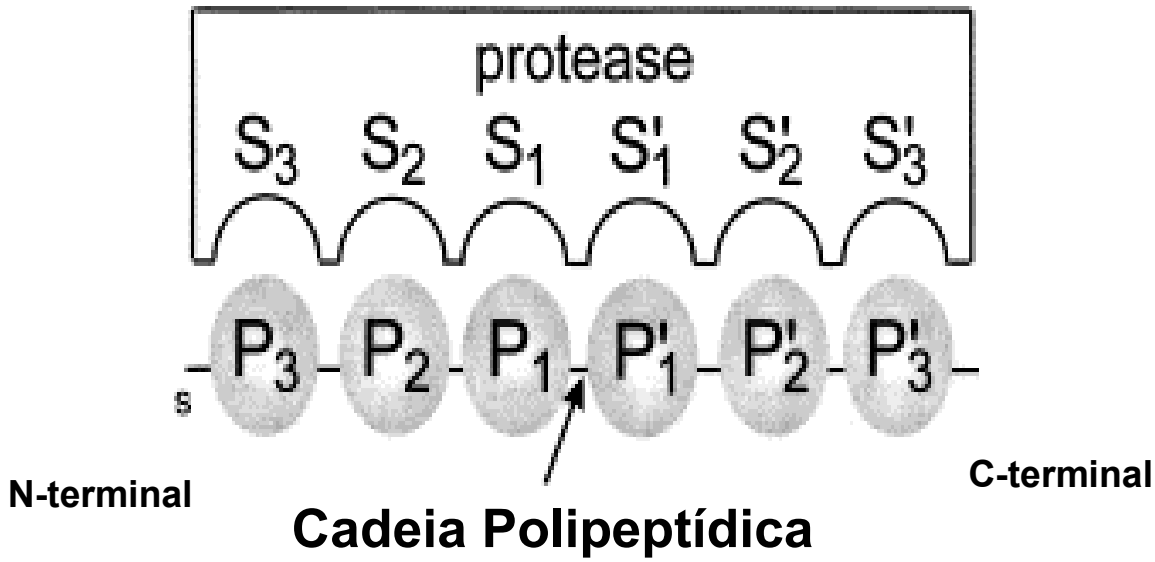

Figura 3. Esquema proposto por Schechter e Berger (1967) no qual o sítio catalítico da peptidase é dividido em subsítios, e cada subsítio possui um aminoácido correspondente no substrato, modificado de (GRAHN et al., 1999).

Estudos cinéticos revelam as variações de posicionamento dos aminoácidos que compõem o substrato, determinando a preferência de ancoragem na enzima conforme a distribuição dos aminoácidos no substrato peptídico. Essas variações de aminoácidos ocorreram em posições definidas como P_3, P_2, P_1, P'_1, P'_2 e P'_3 sendo representada no substrato da seguinte forma Abz-P_3-P_2-P_1-P'_1-P'_2-P'_3-EDDnp. Os parâmetros cinéticos de hidrólise do substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp foram avaliados com variações nas posições P_1, P_2, P_3, P'_1, P'_2 e P'_3.

Os experimentos cinéticos foram obtidos pela adição crescente dos substratos. Os experimentos foram realizados em tampão MES 100 mM pH 6,0 a 55 ºC (enzima *E. javanicum*) e em pH 6,5 a 45 ºC (enzima *M. thermophila*) e espectrofluorimetro com controle de agitação e temperatura. Os comprimentos de onda foram ajustados para λex: 320 nm e λem: 420 nm.

Os valores dos parâmetros cinéticos K_M e V_{max} foram obtidos a partir da equação de Michaelis-Menten calculada por regressão não linear dos dados de hidrólise do

substrato usando o *software* GraphPad Prism 5.0. Foram estudados K_m, k_{cat} e k_{cat}/K_m determinando a preferência da enzima pelos diferentes substratos avaliados.

3.8. Obtenção de peptídeos bioativos

As peptidases isoladas dos extratos produzidos pelos fungos *E. javanicum* e *M. thermophila* foram aplicadas na hidrólise de substratos proteicos com o objetivo de produzir peptídeos e avaliar se os mesmos possuem atividades biológicas.

3.8.1. Substratos proteicos utilizados na geração de peptídeos bioativos

Para a obtenção dos hidrolisados proteicos foram utilizadas as proteínas albumina de ovo e caseína (Sigma Aldrish®), gelatina ultra pura (GE Healthcare) e soro de leite, cedido gentilmente pela empresa Serralat Laticínios LTDA, Serrana, Brasil. O soro de leite passou por um pré tratamento, sendo concentrado por sistema de filtração tangencial com membrana de 10 kDa, liofilizado e armazenado a 4 ºC. Os substratos foram preparados em água destilada, na concentração de 5 % (m/v).

3.8.2. Obtenção dos hidrolisados proteicos

3.8.2.1. Albumina de ovo, caseína e soro de leite

Os hidrolisados proteicos foram obtidos utilizando enzimas produzidas pelos fungos *Myceliophthora termophila* e *Eupenicillium javanicum* ambas sob bioprocesso submerso, além destas duas enzimas foi utilizado a enzima comercial tripsina.

As soluções dos substratos (30 mL) foram hidrolisadas por 5 % (v/v) da solução de cada enzima, com concentração final de 2,5 μg de enzima por μL de substrato proteico. Substrato e enzima foram incubados na temperatura de 45 ºC, 200 rpm, durante 3, 6, 9 e 12 horas. Após tempo de reação, as amostras foram aquecidas durante 15 minutos a 96 ºC. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10000 x *g* durante 10 minutos a 10 ºC, os sobrenadantes foram aliquotados e armazenados a -80 ºC, em seguida foram liofilizados e armazenadas a -80 ºC para futuros ensaios biológicos. Os hidrolisados foram denominados de acordo com enzima utilizada e substrato, EA (enzima isolada do fungo *E. javanicum* + albumina), EC (enzima isolada do fungo *E. javanicum* + caseína), ES (enzima isolada do fungo *E. javanicum* + soro de leite), MA (enzima isolada do fungo *M. termophila* + albumina), MC (enzima isolada do fungo *M. termophila* + caseína), MS (enzima isolada do fungo *M.*+ soro de leite), TA (tripsina + albumina), TC (tripsina + caseína) e TS (tripsina + soro de leite). Em todos os ensaios foram utilizados os hidrolisados de 12 horas, com exceção dos ensaios de atividade oxidante que foi realizado com todos os hidrolisados.

3.8.2.2. Gelatina ultra pura

A enzima produzida pelo fungo *M. thermophila* apresenta atividade colagenolítca, além disso, peptídeos derivados de colágeno apresentam atividade biológica. Mediante a isto, hidrolisados de gelatina ultra pura foram produzidas nas mesmas condições de concentração durante 12 horas de reação com a enzima do fungo *M. thermophila*, e foi denominado MG.

3.9. Determinação do grau de hidrólise dos substratos proteicos (albumina de ovo, caseína e soro de leite)

O grau de hidrólise é a porcentagem de ligações peptídicas clivadas, e foi determinado pela quantidade de grupos de aminoácidos livres, utilizando a reação com o reagente ácido 2,4,6- trinitrobenzeno sulfônico (TNBS), como previamente descrito (ADLER-NISSEN, 1979). Os hidrolisados utilizados foram aqueles produzidos nos diferentes tempos (3,6,9 e 12 horas) de reação, utilizando os substratos proteicos, albumina, caseína e soro de leite, as enzimas utilizadas foram as produzidas pelos fungos *E. javanicum* e *M. thermophila* e enzima comercial tripsina.

As amostras (25 µL) foram reunidas com 200 µL de tampão fosfato de sódio monobásico (0,212 mol/L, pH 8,2) e 200 µL de solução de TNBS (10 mg/mL). A mistura reacional foi incubada a 50 ºC por 60 min. Em seguida, foram adicionados 400 µL de HCl (0,1 mol/L), após 30 min a 30 ºC a mistura foi lida a 340 nm. O branco foi realizado com água, sem amostra, e o número total de aminoácidos livres foi determinado em cada substrato (10 mg), realizando a hidrólise total com 4 mL de HCl (6 mol/L) a 110 ºC por 24 horas, seguido da reação com TNBS.

3.10. Avaliação das atividades biológicas dos peptídeos produzidos por hidrólise enzimática

3.10.1. Atividade antioxidante

Os hidrolisados utilizados nos ensaios de atividade antioxidante foram aqueles produzidos nos diferentes tempos de incubação (3, 6, 9 e 12 horas) de reação, utilizando

os substratos, albumina de ovo, caseína e soro de leite, na presença das enzimas produzidas pelos fungos *E. javanicum* e *M. thermophila* e enzima comercial tripsina.

3.10.1.1. Atividade antioxidante: eliminação de radicais ácido 2,2 azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico (ABTS)

O ensaio com reagente ABTS foi utilizado para avaliar a capacidade dos hidrolisados proteicos em eliminar radicais livres (RE et al., 1999). Este experimento é baseado em gerar radicais ABTS cromóforos através da oxidação por perssulfato de potássio. Os radicais catiônicos ABTS foram produzidos por reação entre 7 mmol/L de solução ABTS e 140 mmol/L de perssulfato de potássio. A reação foi conduzida no escuro durante 12 horas de agitação. Em seguida, a solução de radicais ABTS foi diluída com 5 mmol/L de tampão fosfato pH 7,4 (10 mmol/L Na_2HPO_4, 1,8 mmol/L NaH_2PO_4, 150 mmol/L NaCl), até que a absorbância de 0,7 (±0,02) fosse atingida em leitura de comprimento de onda 734 nm. O ensaio foi realizado com 10 µL de amostra + 1 mL da solução de radicais ABTS diluído. Após 6 min a absorbância foi lida a 734 nm em espectrofotômetro. Trolox foi usado como padrão de referência, a porcentagem de inibição na absorbância 734 nm foi calculada e plotada em função do antioxidante de referência.

3.10.1.2. Atividade antioxidante: ensaio de captura de radicais DPPH (2,2'-difenil-β-picrilhidrazil)

Este método é baseado na captura de radicais DPPH por antioxidantes, promovendo uma diminuição na absorbância em 517 nm (BRAND-WILLIAMS;

CUVELIER; BERSET, 1995). A solução de DPPH foi preparada em álcool metílico na concentração de 60 μmol/L, a solução foi armazenada em frasco âmbar. A solução foi utilizada apenas no dia do ensaio. Aliquotas de 25 μL (125 mg/mL) foram adicionadas a microtubos contendo 975 μL de solução de DPPH e homogeneizadas por agitação, após 45 min, a captura de radicais foi mensurada através da diminuição da absorbância a 517 nm.

O branco foi realizado nas mesmas condições que a reação, com água ao invés de amostra. Os resultados foram expressos como taxa de captura de radicais DPPH (%) = $[1-(A/A_0)]x100$, sendo que, A é a absorbância de cada amostra e A_0 é a absorbância do branco.

3.10.1.3. Atividade antioxidante: ensaio de atividade quelante de metal

O ensaio de atividade em quelar Fe^{2+} foi determinado utilizando protocolo descrito na literatura (CHANG; WU; CHIANG, 2007), com algumas modificações na concentração da amostra. As amostras dos hidrolisados proteicos (250 μL) na concentração de 3,5 mg/mL foram reunidas com 925 μL de água destilada, em seguida, foi realizada a reação com 25 μL de $FeSO_4$ (2 mmol/L) e 50 μL de 5 mmol/L de Ferrozine (3-(2-piridil)-5,6-bis-(4-ácido fenil sulfônico) -1,2,4-triazina). Após 10 min de reação a absorbância foi lida em 562 nm. O controle foi realizado com água (sem amostra), nas mesmas condições da reação e o EDTA (20 mg/mL) foi utilizado como padrão. Os resultados foram expressos como taxa de quelação de metais (%) = $[1-(A/A_0)]x100$, sendo que, "A" é a absorbância de cada amostra e "A_0" é a absorbância do controle.

3.10.1.4. Atividade antioxidante: ensaio de poder redutor

Foi avaliado o poder redutor dos hidrolisados proteicos utilizando protocolo descrito por outros autores (ZHU et al, 2006). A mistura reacional foi composta por 125 µL de hidrolisados protéicos (15 mg/mL) + 625 µL de tampão fosfato de sódio monobásico (0,2 mol/L, pH 6,6) + 625 µL de ferrocianeto de potássio (10 mg/mL), a reação foi incubada por 20 min a 50 ºC. Em seguida, a reação foi interrompida com 625 µL de TCA 10 % (m/v), os tubos foram centrifugados por 10 min a 3000 x *g*. O sobrenadante (250 µL) foi reunido com 625 µL de água destilada + 50 µL de cloreto férrico (1 mg/mL), o poder redutor foi mensurado em 700 nm em espectrofotômetro, sendo que, o aumento na absorbância, significa maior poder redutor. O hidroxitolueno butilado (BHT), na mesma concentração que as amostras, foi utilizado como padrão.

3.10.2. Atividade inibitória de proliferação de células cancerígenas *in vitro*

A atividade inibitória de proliferação de células dos hidrolisados proteicos foi avaliada com ensaios de viabilidade celular com as linhagens celulares de carcinoma epidermóide oral Cal27, com linhagens celulares de melanoma murino B16F10 (ATCC: CLR-6475), com queratinócitos normais oral (NOK) e fibroblasto de tecido gengival normal (GN).

3.10.2.1. Ensaio de viabilidade celular com células orais (Cal27, NOK e GN)

Os ensaios foram realizados com os hidrolisados obtidos das proteínas, albumina de ovo, caseína e soro de leite obtidos de hidrólise de 12 horas com as enzimas dos fungos *E. javanicum* a *M. thermophila* e enzima comercial tripsina.

O método foi baseado no uso da resazurina (O'BRIEN et al., 2000) o qual correlaciona sua redução com a proliferação celular. As células Cal27, NOK e GN foram distribuídas em triplicata em placa de 96-poços (3000 células/poço) e mantidas em meio de Eagle modificado por Dulbecco´s (DMEM; Sigma Aldrish®) contendo 10 % de soro fetal bovino (FBS; Gibco) e 1 % antibiótico e antimicótico (Sigma Aldrish®). Os experimentos foram realizados em atmosfera úmida contendo 5 % de CO_2. Após 24 horas o meio de cultura foi trocado, mantendo as células em meio sem FBS por 16 horas. Em seguida, foram realizados os tratamentos na concentração de 4 mg/mL de cada composto, os controles do experimento foram as células mantidas apenas com DMEM sem FBS e células mantidas com DMEM sem FBS mais 20 % de DMSO, dependendo do tipo de célula tumoral, estes tratamentos foram mantidos por 24, 48 e 72 horas para as células tumorais e apenas 72 horas para as células normais. Após a incubação foi adicionado meio com indicador de pH (vermelho de fenol) com 0,01 mg de resazurina/mL e mantidos protegido da luz por 4 horas em estufa de CO_2 a 37 ºC. A absorbância foi medida em fluorímetro de placas Synergy 2 Multi-Mode Microplate Reade (Biotek), com excitação 530/25 nm, emissão 590/35 nm.

3.10.2.2. Ensaio de Viabilidade Celular com células de melanoma murino B16F10 (ATCC: CLR-6475)

Os ensaios foram realizados com tratamentos de hidrolisados obtidos a partir de albumina de ovo, caseína e soro de leite obtidos após a proteólise por 12 horas com as enzimas dos fungos *E. javanicum* a *M. thermophila* e enzima comercial tripsina. E também foi utilizado gelatina ultra pura após hidrólise por 12 horas com a enzima do fungo *M. thermophila*.

Para as células de melanoma o ensaio foi conduzido como descrito no item anterior com modificações no tipo de meio, foi utilizado HAM–F10 (Gibco), pH 6,9 suplementado com 1,2 g/L de bicarbonato de sódio com 10 % de FBS.

3.10.3. Atividade inibitória de proliferação de células cancerígenas em camundongos

Foram realizados ensaios *in vivo* pela infusão de células Cal27 em camundongos imunodeficientes Balb/C nude. O protocolo de uso dos animais e da experimentação foi aprovado pela Comissão de Ética do uso de animais (Protocolo n° 12.1.1756.53.6).

3.10.3.1. Camundongos machos da linhagem Balb/C nude

Os animais são camundongos machos da linhagem Balb/C nude de 8 semanas, atímicos, com peso 17 ± 2 g. Estes foram adquiridos do biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, e foram mantidos no biotério convencional da FCFRP, USP, Ribeirão Preto. Para a experimentação, os animais foram mantidos em rack ventilada e mini-isoladores, temperatura constante de 22 ºC, em ciclo claro/escuro de 12 horas, com ração e água à vontade. Os animais foram mantidos numa sala específica separada.

3.10.3.2. Xenoenxerto de células cancerígenas Cal27 em camundongos Balb/C nude

Para determinar a atividade do peptídeo selecionado na formação de tumores xenográficos utilizando células de CEC oral (Cal27), foram injetados $5x10^5$ células em um volume total de 100 µl, sendo 50 µl de células em meio Dulbecco (DMEM) sem soro fetal bovino e 50 µl de Matrigel na região subcutânea do dorso dos animais (n= 4 por grupo, sendo controle e teste, 1 grupo para cada hidrolisado protéico). O tratamento foi iniciado após 4 semanas, tempo para crescimento e estabelecimento do tumor.

3.10.3.3. Tratamento intratumoral com hidrolisados proteicos

O tratamento foi realizado com os dois tipos de hidrolisados que se destacaram no ensaio *in vitro*. As soluções de peptídeos foram preparadas em água ultra pura, com manipulação de materiais estéreis, em cabine de segurança classe 2. Após o preparo da solução, esta foi filtrada em membrana de 22 micras, concentração final da solução foi de 50 µg/µl. O tratamento foi realizado com injeções intratumorais de 10 µL de solução a cada 72 horas, sendo, salina no grupo controle e hidrolisados proteicos nos grupos tratados. Os animais foram examinados diariamente e as dimensões dos tumores foram medidas com o auxílio de um paquímetro a cada 2 dias. O volume dos tumores foi expresso em mm^3 e calculado pela seguinte formula V=0,5 x comprimento x $largura^2$. Após 82 dias, os animais foram eutanasiados, com a coleta do tumor para processamento histológico e obtenção de amostras de proteína para análises do potencial efeito do peptídeo.

3.11. Estudos das diferentes proteínas expressas nos tratamentos de inibição de proliferação de células cancerígenas *in vitro* e *in vivo*

Ensaios proteômicos foram realizados para avaliar a expressão proteica em cada condição testada, delineando assim um possível mecanismo de ação destes hidrolisados proteicos sobre a atividade antitumoral.

3.11.1. Cultivo das células das linhagens cancerígenas Cal27 e B16F10 para estudos proteômicos

Os hidrolisados proteicos que apresentaram inibição da proliferação celular das células tumorais, foram reincubados com uma maior quantidade de células, suficientes para os ensaios proteômicos, a concentração dos hidrolisados em relação as células tumorais foi a mesma que o ensaio de viabilidade celular (4 mg/mL). As células Cal27 e B16F10 foram distribuidas em placas de cultura de 100 mm com $1x10^7$ células, mantidas em DMEM ou HAM–F10, respectivamente, os meios foram suplementados com 10 % de FBS e 1 % antibiótico/antimicótico. Após 24 horas foram adicionados os hidrolisados selecionados no ensaio anterior, em seus respectivos meios, entretanto sem FBS. As células Cal27 foram mantidas sob o tratamento por 72 horas e as células B16F10 foram mantidas por 48 horas. Após este tempo, as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas, centrifugadas a 1200 rpm por 5 min. O passo anterior foi realizado novamente para garantir a remoção de todo o meio. O *pellet* foi então congelado a -80 ºC para extração proteica.

3.11.1.1. Estudos proteômicos das células Cal27: preparo das amostras

3.11.1.1.1. Extração proteica

As proteínas intracelulares foram obtidas após lise celular segundo Baik et al. (2011), com modificações. A quantidade de $1x10^7$ de células foram lisadas em 500 uL de tampão contendo 8 M ureia, 4 % CHAPS, 50 mM ditiotreitol (DTT) preparados em solução com coquetel de inibidores de peptidases (cOmplete Ultra - Roche).

3.11.1.1.2. Quantificação das proteínas

A concentração total de proteínas de cada amostra foi determinada em triplicata, pelo ensaio de Bradford Protein Assay (Bio-Rad, California, USA). Após a quantificação, um pool representativo de cada grupo foi preparado.

3.11.1.1.3. Estudos proteômicos das células Cal27: eletroforese 2D - focalização isoelétrica

Após a determinação de proteínas totais, as amostras foram suplementadas com 0,002 % de azul de bromofenol, 0,5 % de IPG *buffer* e 2,8 mg/mL de DTT. As amostras do proteoma (150 mg/mL de proteínas) foram reidratadas passivamente em tiras de 13 cm com pH imobilizado de 3 a 10, por 16 horas a 20 °C. As tiras reidratadas com as amostras foram acomodadas em placa de cerâmica, cobertas com óleo mineral e, após o ajuste dos eletrodos foram focalizadas utilizando o sistema Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare Life Sciences). Os parâmetros da focalização foram ajustados a quantidade de tiras e tipo de método a ser utilizado com o auxílio do Ettan IPGphor 3 Control Software. As condições utilizadas permitiram o acúmulo de 15500 Vh e as etapas estão indicadas a seguir: 1 – contínua com acumulado de 500 Vh; 2 – gradiente com acumulado de 800 Vh; 3 – gradiente com acumulado de 11300 Vh; 4 – contínua com acumulado de 2900 Vh.

3.11.1.1.4. Estudos proteômicos das células Cal27: eletroforese 2D - eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS/PAGE)

Para a segunda dimensão, as tiras foram equilibradas em tampão de equilíbrio SDS (6 M ureia, 75 mM Tris-HCl pH 8,8, 29,3 % glicerol, 2 % SDS, 0,002 % azul de bromofenol) com DTT (10 mg/mL) por 15 minutos sob agitação a 20 °C. Após este período a solução foi removida e foi adicionado tampão de tampão de equilíbrio SDS suplementado com iodoacetamida (25 mg/mL). As tiras foram incubadas por 15 minutos sob agitação a 20 °C e após este período, a solução foi removida.

Para as amostras focalizadas em tiras de 13 cm foram utilizados os aparatos para géis de 16 x 18 cm (GE Healthcare Life Sciences) com espessura de 1,5 mm. As tiras já equilibradas foram acomodadas horizontalmente sobre a superfície no gel de poliacrilamida homogêneo 12,5 % de tamanho adequado e com o auxílio de papel filtro foi aplicado o marcador de massa molecular Amersham ECL *Full-Range Rainbow* (GE Healthcare Life Sciences). As placas foram seladas com solução de agarose (25 mM Tris base, 192 mM glicine, 0,1 % SDS, 0,5 % agarose, 0,002 % azul de bromofenol). Para a realização da corrida, a cuba SE 600 Ruby (GE Healthcare Life Sciences) foi acoplada ao banho termostático MultiTemp™ IV Thermostatic Circulator (GE Healthcare Life Sciences) e preenchida com tampão Tris-glicina (25 mM Tris base, 192 mM glicina, 0,1 % SDS). O tampão foi equilibrado a 10 °C e o aparato com os géis foram acomodados na cuba. Os parâmetros da corrida foram ajustados na fonte EPS-601 (GE Healthcare Life Sciences) fixando a amperagem da seguinte maneira: 15 mA por gel durante os 15 minutos iniciais e 30-60 mA por gel até a finalização da corrida. Após o término da

eletroforese, os géis foram fixados (10 % ácido acético, 40 % etanol) por 16 horas a 20 °C. Para a coloração, os géis foram retirados do fixador e mantidos na solução *Colloidal Coomassie Blue* G-250 (8 % sulfato de amônio, 0,8 % ácido fosfórico, 0,08 % Coomassie Blue G-250, 20 % metanol) por 16 horas a 20 °C. A descoloração e remoção do resíduo de corante foram realizadas com sucessivas trocas de água ultrapura.

3.11.1.1.4.1. Obtenção e análise de imagens dos géis bidimensionais

Os géis bidimensionais foram digitalizados com o auxílio do densitômetro DS-6000 (Loccus Biotecnologia) utilizando o modo transparente e a resolução de imagem de 300 dpi. As imagens capturadas foram analisadas no programa Image Master 2D Platinum v7.0 (GE Healthcare Life Sciences) para a detecção dos *spots*, para a determinação de massa molecular, ponto isoelétrico e para a comparação dos volumes dos *spots* (níveis de abundância) em condições de tratamentos diferentes. Para a coleta dos *spots* de interesse foram estabelecidos os seguintes critérios: *spots* exclusivos de uma determinada condição e *spots* diferencialmente expressos (ANOVA com $\alpha < 0,05$). Os *spots* selecionados de cada condição foram coletados com o auxílio de agulhas hipodérmicas estéreis, armazenados em tubos e congelados a -80 °C até o momento da análise por espectrometria de massas.

3.11.1.1.5. Digestão tríptica

Antes de serem submetidos à digestão tríptica, os *spots* selecionados foram descorados com sucessivas trocas de 100µL de solução descorante contendo 50 % de

acetonitrila (ACN) e 0,1 M de NH_4HCO até que a amostra ficasse transparente. O material descorado foi desidratado com ACN 100 %, por 10 minutos a 20 °C. A solução foi descartada e o excesso de solvente removido em centrífuga a vácuo. Os *spots* desidratados foram incubados com 100-200 ng de tripsina de pâncreas de porco dimetilada, grau proteômica (Sigma) e 100 µL de solução 100 mM de NH_4HCO_3, por 22 horas. A reação foi interrompida com 5 µL de ácido fórmico e a solução contendo os peptídeos trípticos foi mantida a 20 °C por 4 horas.

3.11.1.1.6. Purificação das amostras

Após este período, os peptídeos trípticos foram coletados e submetidos a concentração e dessalinização em resina de fase reversa POROS® R2 (Applied Biosystems®). Para essa etapa, inicialmente, foram montadas colunas utilizando ponteiras de 200 µL nas quais foram compactados fragmentos de cerca de 0,2 cm^2 de fibra de vidro (Filtro AP40, Merck Millipore) sobre a qual 20 µL de resina POROS® R2 em metanol absoluto foi empacotada. A solução de peptídeos foi aplicada na resina, após o equilíbrio em 2 etapas com 200 µL de ácido fórmico 0,2 %. A lavagem da resina também foi realizada em 2 etapas com 200 µL de ácido fórmico 0,2 %. Após a remoção do material não ligado a resina, os peptídeos foram eluídos em micro-tubos de 200 µL com 50 µL de solução 5 % ácido fórmico e 60 % metanol.

3.11.1.1.7. Espectrometria de massas (MALDI-TOF/TOF)

Os peptídeos foram secos em centrífuga a vácuo e, após esta etapa, foram misturados com uma solução de matriz ácido α-ciano-4-hidroxicinaminico (Sigma) (5

mg/mL solubilizada em 50 % ACN e 0,1 % ácido trifluoracético (v/v)). Esta solução foi aplicada em placa e os espectros MALDI MS/MS foram adquiridos utilizando MALDI-TOF/TOF-MS (Axima Performance, Kratos-Shimadzu) utilizando como calibrante externo uma mistura de peptídeos (Sigma). O ensaio foi realizado sob supervisão do Prof. Dr. José César Rosa Neto no departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do ICB-USP.

3.11.1.1.8. Determinação das sequências e análise funcional das proteínas identificadas

Os dados MS/MS de cada *spot* digerido foram analisados utilizado MASCOT software version 2.2 *on line* (http://www.matrixscience.com.br) (Matrix Science, London, UK) para a busca de proteínas na base de dados do Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (sigla em inglês NCBI) NCBIprot 20161127 (106762850 sequências; 39119668168 resíduos) e SwissProt 2016_10 (552884 sequências; 197760918 resíduos). Os parâmetros de busca definidos para o MASCOT foram: restrição taxonômica Homo sapiens (NCBIprot 310241 sequências e SwissProt 20121 sequências); clivagem por tripsina e com permissão para até duas clivagem perdida; modificação fixa da cisteína – carbamidometil; modificação variável da metionina – oxidação; tolerância do peptídeo: 1,2 Da; tolerância do fragmento iônico MS/MS: 0,8 Da e massas médias. Os resultados com identidade (*random hit* de $p < 0.05$) foram submetidos às análises funcionais no software on line Blast2GO basic (https://www.blast2go.com/).

3.11.1.2. Estudos proteômicos das células B16F10 e tumores *in vivo*:

3.11.1.2.1. Extração proteica

As células B16F10 foram lisadas com o auxílio de agitação em vórtex e os tumores dos camundongos foram macerados com o auxílio do equipamento Tissue Ruptur (Qiagen), ambos na presença de tampão de extração, Tris-HCL 0,5 M pH 7,5, KCL 0,1 M, EDTA 0,05 M pH 8,0, sacarose 0,7 M e coquetel de inibidor de peptidases com concentração segundo instruções do fabricante (cOmplete Ultra - Roche) + 15 µL betamercaptoetanol. A quantidade de tampão utilizada foi o suficiente para solubilizar as amostras na maior concentração possível. Em seguida, foi adicionado 750 µL de fenol equilibrado com 10 mM de Tris-HCL (pH=8.0), homogeneizou-se em isopor com gelo em *shaker* (30 minutos, 120 rpm). Centrifugou-se a 10000 x *g* por 30 minutos a 4 ºC. O sobrenadante foi recuperado e transferido para um novo tubo. A adição de tampão de extração, centrifugação e separação de sobrenadante foi repetida mais duas vezes. Cada amostra foi transferida para microtubo com tampão de precipitação (100 % metanol + 0.1 M de acetato de amônio, pré refrigerado a – 20 ºC), e armazenada a – 20 ºC, "*overnight*". Após esta etapa, o sobrenadante foi descartado e foi adicionado tampão de lavagem (100 % metanol + 0,1 M acetato de amônio, pré refrigerado a - 20 ºC), sem pertubar o *pellet*, armazenou-se a – 20 ºC por 1 hora, centrifugou-se a 16000 x *g* por 30 minutos a 4 ºC. Esta etapa de lavagem foi realizada duas vezes. Em seguida, descartou-se o sobrenadante e 1 mL de tampão de lavagem II (100 % acetona, pré refrigerado a – 20 ºC) foi adicionado sem pertubar o *pellet*, armazenou-se a – 20 ºC por 1 hora, centrifugou-se a 16000 x *g* por 30 minutos a 4 ºC. O sobrenadante foi descartado e *pellet* foi armazenado a 4 ºC (*overnight*). Após este tempo, o *pellet* foi ressuspendido em tampão de solubilização (uréia 7,0 M, tiouréia 2,0 M, DTT 10 mM e Triton X-100 0,01 %. A solução foi

centrifugada a 20000 x *g* durante 30 min para remover possíveis impurezas, após esta etapa o sobrenadante foi recuperado.

3.11.1.2.2. Quantificação das proteínas

A concentração total de proteínas de cada amostra foi determinada em triplicata, pelo ensaio de Bradford (Bio-Rad, California, USA). Após a quantificação, foi preparado um pool representativo de cada uma das amostras para prosseguir para as etapas posteriores.

3.11.1.2.3. Digestão triptica

Inicialmente, 50 µL de uma solução de 1µg.µL^{-1} de cada amostra foram desnaturados por 15 minutos a 80 °C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (pulso), e 2,5 µL de ditiotreitol (DTT) 100 mM (GE Healthcare, Amersham Place, UK) foram adicionados. As amostras foram aquecidas a 60 ºC por 30 minutos, resfriadas à temperatura ambiente e novamente centrifugadas (pulso). Em seguida, adicionou-se 2,5 µL de iodoacetamida 300 mM (GE Healthcare, Amersham Place, UK). As amostras foram incubadas por 30 minutos, à temperatura ambiente, no escuro. A digestão foi realizada por meio da adição de 10 µL de uma solução de tripsina (Promega, Wisconsin, EUA) em 50 mM de bicarbonato de amônio, a uma razão de 1:100 enzima/proteína e a amostra foi incubada a 37 ºC, por 16 horas. Após a digestão foram adicionados 10 µL de ácido trifluoracético 5 % (Merck, Hohenbrunn, Alemanhã). As amostras foram incubadas a 37 ºC por 90 minutos e na sequência, foram centrifugadas a 14000 x g, por 30 min a 6 ºC. O sobrenadante foi transferido para frascos de vidro (total recovery vial, Waters,

Millford, MA, EUA), e secas em centrifuga a vácuo.

3.11.1.2.4. Purificação das amostras

Às amostras secas a vácuo foram adicionados 10µL de solução 0,1 % TFA em H_2O. Após esse passo cada amostra foi purificada utilizando micro colunas de fase reversa (Reverse phase Zip-Tip C18, Millipore). Para isso, as colunas foram equilibradas em solução A [100 % acetonitrila (ACN), 0,1 % (v/v) TFA], solução B [50 % (v/v) ACN:H_2O, 0,1 % (v/v) TFA] e solução C [100 % H_2O, 0,1 % (v/v) TFA], respectivamente. Após o equilíbrio, as amostras proteicas puderam ser ligadas à coluna, desta maneira, procedeu-se a lavagem com solução D [95 % H_20, 5 % (v/v) metanol, 0,1 % (v/v) TFA]. Para a eluição dos peptídeos, 10µL de solução B foram aspirados e acondicionados em tubos de vidro borosilicato (Waters Total Recovery vials). Seguiu-se nova concentração a vácuo.

3.11.1.2.5. Espectrometria de massas (LC-MS^E)

As amostras foram ressuspendidas em 32 uL de Formiato de amônio 20 mM pH 10 e 8 uL de álcool desidrogenase de levedura (ADH, SwissProt P00330, padrão interno-100 fmo.μL^{-1}). Os peptídeos foram seqüenciados no espectrômetro de massas Synapt G2 HDMS (Waters), acoplado ao sistema Acquity UPLC MClass, com tecnologia 2D (Waters), no laboratório de genética fisiológica – ESALQ – USP, Piracicaba, São Paulo, Brasil. Os peptídeos foram capturados por uma coluna Trap 2D Symmetry C18 (5 µm, 180 µm x 20 mm) (Waters). A separação foi realizada com uma coluna de primeira dimensão Acquity UPLC M-Class peptide BEH C18 (5 µm, 300 µm x 50 mm) (Waters)

e uma coluna analítica Acquity UPLC M-Class peptide CSH C18 (1.7 µm, 75 µm x 150 mm) (Waters). As fases móveis da primeira dimensão são: solução de formiato de amônio 20 mM pH 10 e acetonitrila. Já na segunda dimensão os dois eluentes foram: A (100 % água contendo 0,1 % de ácido fórmico) e B (100 % acetonitrila contendo 0,1 % ácido fórmico). Essa técnica combina a separação das proteínas usando-se um pH de 10, na separação da primeira dimensão e um pH de 2 na segunda dimensão, com auxílio de colunas de fase reversa (GILAR et al., 2005). A eluição foi realizada usando-se 5 gradientes binários diferentes de 20 mM de formiato de amônio pH 10 e acetonitrila, a um fluxo de 2 $\mu L.min^{-1}$. A proporção de acetonitrila da primeira fração até a quinta variou de 11,4 a 50 %. Os peptídeos eluídos da coluna da primeira dimensão foram diluídos em linha com 0,1 % de ácido fórmico em acetonitrila a um fluxo de 20 $\mu L.min^{-1}$ e capturados por uma coluna Trap 2D Symmetry. A separação, na segunda dimensão, foi realizada comum gradiente binário de 7 a 85 % de acetonitrila, em 0,1 % (v:v) de ácido fórmico durante 75 minutos, a um fluxo de 500 $nL.min^{-1}$.

A aquisição dos dados foi realiZada em um espectrômetro de massas do tipo quadrupolo (Q-TOF) com tempo de voo, Synapt G2 MS, equipado com uma fonte *nanolockspray* operando no modo positivo (Waters, Manchester, UK), com mobilidade de íon. Para todas as análises, o espectrômetro de massas operou no modo “V”, com a cela de mobilidade de íon ativada. O espectrômetro de massas foi calibrado com [Glu1] fibrinopeptídeo B (GFP) humana 1 $pmol.\mu L^{-1}$ e a mesma solução foi empregada para o "*lock mass*" utilizando-se o íon de dupla carga com uma amostragem a cada 30 segundos. Os experimentos foram realizados no modo $HDMS^E$ (análise independente de dados) que consiste na aquisição alternada, entre espectros obtidos à baixa (3 eV) e alta (15-50 eV) energia de colisão, aplicadas ao módulo *trap* do ‘*T-wave*’ CID, em presença de gás argônio, que produz íons precursores e produtos em sequência. O tempo de varredura foi

de 0,8 segundos em cada modo, no intervalo de m/z entre 50 e 2000.

3.11.1.2.6. Determinação das sequências e análise funcional das proteínas identificadas

Os espectros de massas foram processados utilizando o *software* ProteinLynx GlobalServer (PLGS) versão 3.1, com o banco de dados reverso de Human Reviewed UNIPROT (http://www.uniprot.org/uniprot/?query=proteome:UP000005640; 550740 proteínas). Os parâmetros de processamento incluíram: tolerância automática para precursores e íons-produto; mínimo de fragmentos iônicos correspondentes por peptídeo; mínimo de 7 fragmentos iônicos correspondentes por proteína; mínimo de 2 peptídeos correspondentes por proteína; um possível erro de clivagem pela tripsina; carbamidometilação de cisteína como modificação fixa e oxidação de metionina como modificação variável; taxa máxima de descoberta de falso positivo (FDR) a 4 %. Os resultados foram submetidos às análises funcionais no *software on line* Blast2GO basic (https://www.blast2go.com/).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados apresentados nesta tese foram divididos em purificação e caracterização das peptidases produzidas pelos fungos *E.javanicum* e *M. thermophila* e aplicação desta peptidases na produção de hidrolisados proteicos e avaliação da atividade biológica.

4.1. *Eupenicillium javanicum*: bioprocesso em meio submerso

A produção de peptidases pelo fungo *Eupenicillium javanicum* foi realizada por bioprocesso submerso, no qual o fungo secretou peptidases em meio de cultivo com pH inicial de 5,0, a 30 °C, 120 rpm e 144 horas de incubação. A quantidade total de enzimas produzidas foram 20010 U.A.

4.1.1. Purificação da enzima secretada pelo fungo *Eupenicillium javanicum*

Para a caracterização e emprego da peptidase produzida pelo fungo *E. javanicum* é necessário a purificação da enzima, desta maneira, delineamos os ensaios para a obtenção da enzima pura com a utilização de dois processos cromatográficos. Inicialmente a enzima foi separada de alguns componentes do extrato com a utilização de uma cromatografia de exclusão de massa molecular, a qual separa os componentes da amostra por tamanho. Em seguida, foi utilizado cromatografia em troca iônica, a qual separou a molécula de interesse dos outros componentes por diferença de carga.

Após os dois processos cromatográficos do extrato enzimático produzido pelo fungo *Eupenicillium javanicum*, houve uma recuperação de 44 % de toda enzima produzida e a taxa de purificação de 149 vezes (Tabela 1).

A Figura 4 apresenta o perfil de eluição do extrato bruto após cromatografia de exclusão de massa molecular em resina Superdex 75. Nesta cromatografia foram obtidos quatro picos em 280 nm, que podem ser correspondentes a proteínas. A peptidase foi eluida entre os picos II e III, entre os volumes 47 e 65 mL. Estas frações foram submetidas a dialise em tampão tris-HCl 50 mM pH 8,0, para a remoção de todo NaCl.

Em seguida, esta amostra foi aplicada em resina source 15Q com a obtenção de um novo perfil proteico (Figura 5). Foram obtidos dois picos na absorbância de 280 nm, sendo que o pico II, volume de 16 a 19 mL, que apresentou atividade proteolítica.

A fração com atividade proteolítica foi submetida a eletroforese SDS-PAGE a 12 %, (Figura 6). Analisando o gel, observamos a presença de uma única banda, o que certificou a pureza da amostra, além disso, a massa molecular da peptidase foi estimada em aproximadamente 28,2 kDa. Merheb-Dini et al. (2009) isolaram uma metalopeptidase do extrato de bioprocesso em estado sólido do fungo *Thermoascus aurantiancus*, a enzima foi purificada após três processos cromatográficos, a massa molecular foi estimada em 24,5 kDa. Hatanaka e Uesugi (2005) observaram a produção de uma metalopeptidase por bioprocesso em meio submerso por *Streptomyces septatus* TH-2, e após três etapas de purificação obtiveram um rendimento de 16,6 % e uma taxa de purificação de 2,2 vezes.

Tabela 1. Etapas de purificação da peptidase produzida pelo fungo *Eupenicillium javanicum*, pelo bioprocesso submerso com pH inicial de 5,0, durante 144 horas, 30 °C e 120 rpm.

Etapa	**Unidades Totais (U)**	**Proteinas Totais (mg)**	**Atividade Específica (U/mg)**	**Rendimento (%)**	**Taxa de purificação**
Extrato	20010	3015	6,637	100	1
Superdex 75	13673	68	201,073	68	30
Source 15Q	8899	9	988,777	44	149

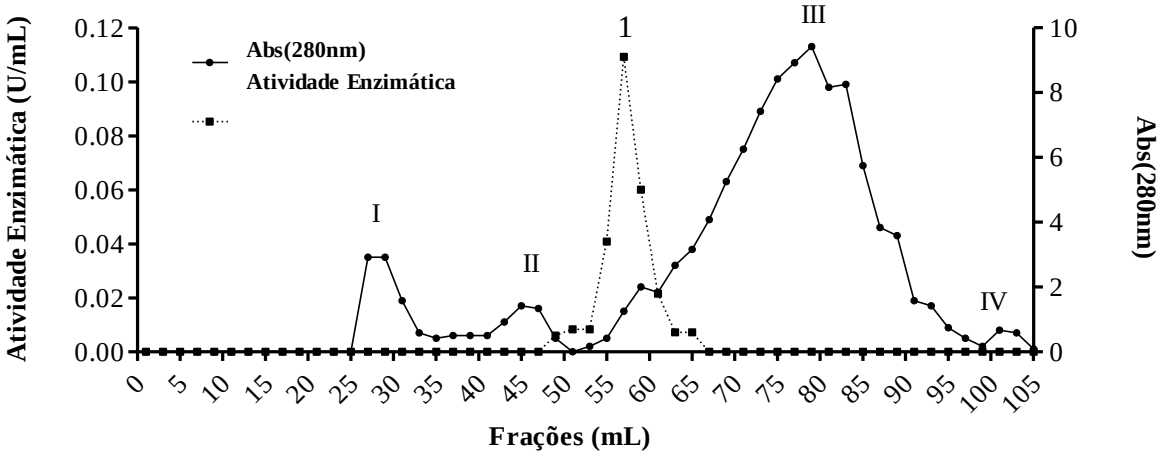

Figura 4. Perfil de eluição do extrato bruto proveniente do bioprocesso submerso do fungo *Eupenicillium javanicum*, utilizando a resina Superdex 75, com eluição isocrática, utilizando tampão Tris-HCl 50 mM + 150 mM de NaCl, pH 8,0. A vazão foi mantida em 0,62 mL/min e foram coletadas frações de 5 mL.

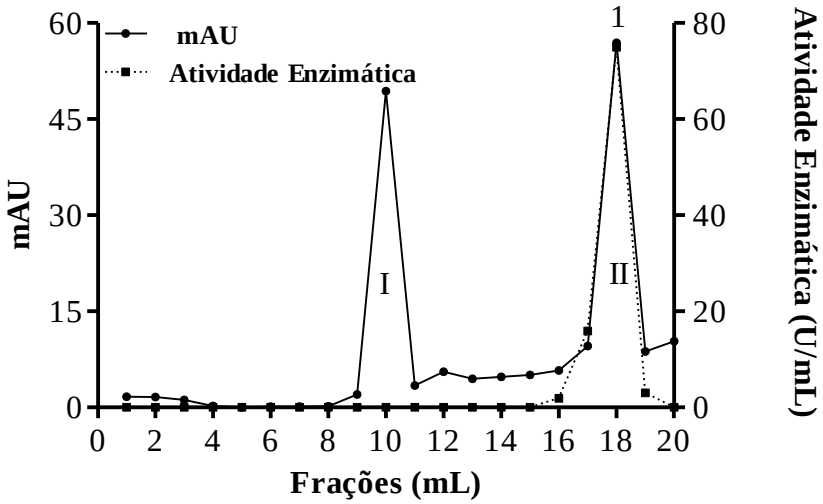

Figura 5. Perfil de eluição da cromatografia de troca iônica com resina Source 15Q. A eluição foi em gradiente salino linear de 0 a 100 mM de NaCl, em tampão tris-HCl 50 mM, pH 8,0. A vazão foi mantida em 0,3 mL/min e foram coletadas frações de 1 mL.

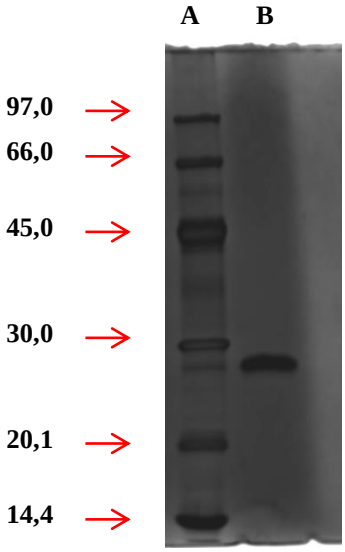

Figura 6. Imagem do gel SDS-PAGE 12 %, corado com nitrato de prata da enzima purificada produzida pelo fungo *Eupenicillium javanicum*. (A) marcador de baixa massa molecular (LMW-SDS Marker Kit – GE) e (B) peptidase purificada, após as etapas de cromatografia em resina Superdex 75 (exclusão de massa molecular) e resina Source 15Q (aniônica), respectivamente.

4.1.2. Ensaios de caracterização bioquímica da enzima secretada pelo fungo *Eupenicillium javanicum* utilizando substrato FRET

4.1.2.1. Efeito de pH: pH ótimo e estabilidade

O estudo de caracterização bioquímica foi iniciado com a determinação do efeito do pH sobre a atividade proteolítica da peptidase. De acordo com o resultado encontrado, o pH ótimo de reação foi 6,0. Em pH 6,5 foi observado uma queda cerca de 20 % da atividade da enzima, porém nos valores de pH 7,0 e 7,5 foi observado um aumentou de atividade de 10 % em relação ao pH 6,5. Assim a peptidase apresenta possivelmente dois pontos de ionização dos resíduos do sítio catalítico o que confere estes dois picos, visto que o ensaio foi realizado com a enzima pura, ou seja, não havia outra peptidase no meio reacional (Figura 7).

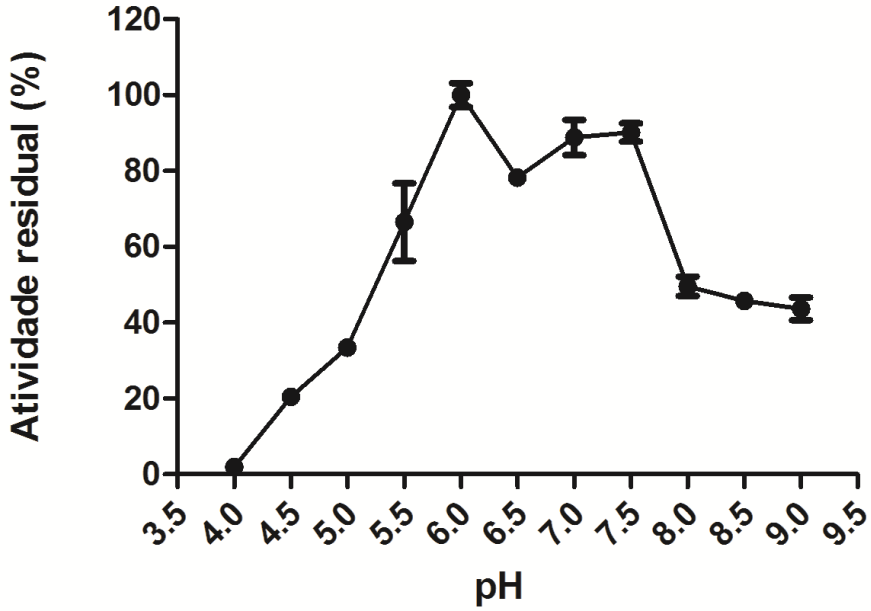

Figura 7. Influência dos diferentes valores de pH sobre a atividade proteolítica da peptidase purificada do fungo *Eupenicillium javanicum*. A atividade proteolítica foi determinada em triplicata com substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp a 45 °C.

Outros autores também isolaram peptidases neutras secretadas por microrganismos, *Penicillium digitatum* (AISSAOUI et al., 2014) *Penicillium italicum* (ABIDI et al., 2014), *Graphium Putredinis* e *Trichoderma harzianum* (SAVITHA et al., 2011), os quais produziram serino peptidases com pH ótimo 7,0. As metalopeptidases produzidas por *Microbacterium* sp (THYS; BRANDELLI, 2006), *Penicillium spp* (El-GENDY, 2010), *Thermoascus aurantiacus* (MERHEB-DINI et al., 2009) e *Streptomyces septatus* TH-2 (HATANAKA; UESUGI, 2005) também apresentaram pH ótimo neutro.

A estabilidade da enzima em diferentes faixas de pH foi avaliada após 60 minutos de exposição a 25 ºC . O resultado obtido mostra que a enzima apresenta estabilidade em ampla faixa de pH, com manutenção de cerca de 80 % ou mais de sua atividade entre 4,5 e 10,0, sendo que, maior estabilidade foi encontrada em valores de pH 7,0 e 7,5, com atividade relativa de aproximadamente 96,5 % e 100 %, respectivamente (Figura 8).

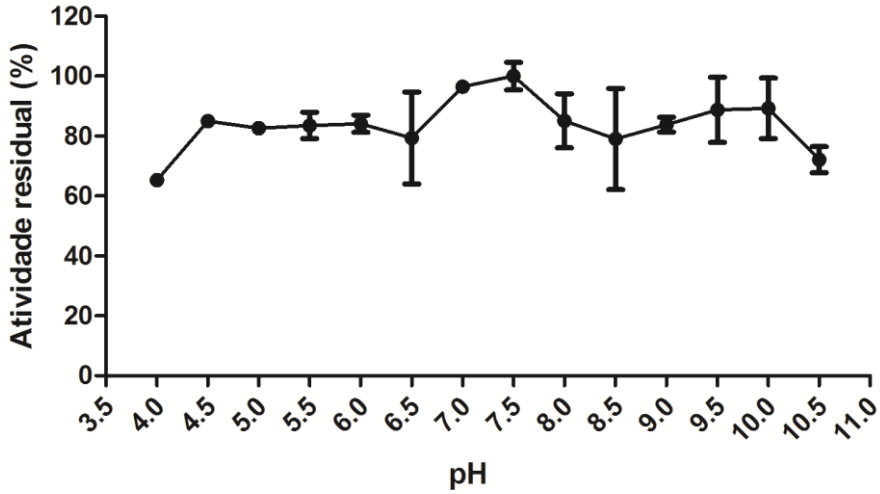

Figura 8. Estabilidade da peptidase isolada do bioprocesso submerso do fungo *Eupenicillium javanicum*, frente à exposição a diferentes valores de pH durante 60 minutos a 25 ºC. A atividade proteolítica foi determinada em triplicata com substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp a 55 °C, pH 6,0.

Resultados semelhantes foram encontrados com peptidases produzidas por *Penicillium italicum* (ABIDI et al., 2014) e *Beauveria* sp (SHANKAR; RAO; LAXMAN, 2011) que mantiveram atividade proteolítica nas faixas de pH entre 4,0 a 11,0 e 3,0 a 11,0, respectivamente. Por outro lado, a peptidase produzida por *Botrytis cinerea* apresentou estabilidade de pH 6,0 a 9,0 (ABIDI et al., 2011). As metalopeptidases produzidas por *Penicillium* spp. mostraram estabilidade nas faixas de pH entre 6,0 a 8,0 e 6,0 a 11,0 (EL-GENDY, 2010), inferior a estabilidade da enzima isolada do bioprocesso submerso do fungo *E. javanicum*.

4.1.2.2. Efeito de temperatura: temperatura ótima e estabilidade

O efeito da temperatura sobre a atividade da peptidase foi avaliado entre 35 e 80 ºC, e a peptidase apresentou um aumento da atividade até 55 ºC, sendo esta determinada como temperatura ótima aparente de reação enzimática (Figura 9). Acima desta

temperatura a atividade apresenta queda, sendo que, a 70 ºC a enzima manteve aproximadamente 70 % de sua atividade, a 75 ºC manteve cerca de 40 % de atividade residual, valor considerado elevado para uma enzima originada de um fungo mesofílico.

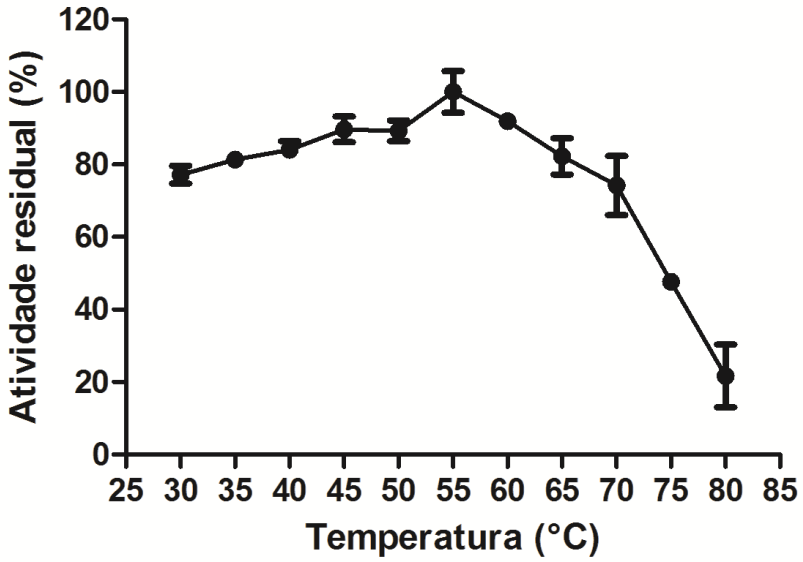

Figura 9. Influência de diferentes temperaturas sobre a atividade proteolítica da peptidase isolada do bioprocesso submerso do fungo *Eupenicillium javanicum*. A atividade proteolítica foi determinada em triplicata com substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp em pH 6,0.

Os microrganismos *Penicillium italicum* (ABIDI et al., 2014), *Penicillium crysogenum* (CHEN et al., 2013), *Botrytis cinerea* (ABIDI et al., 2011), *Graphium Putredinis* e *Trichoderma harzianum* (SAVITHA et al., 2011) produziram peptidases com temperatura ótima a 50 °C, no entanto, a serino peptidase de *Penicillium waksmanii* (GRAMINHO et al., 2013) apresentou máxima atividade a 35 ºC. A metalopeptidase isolada do biopocesso do fungo *Thermoascus aurantiacus* apresentou temperatura ótima a 75 ºC (MERHEB-DINI et al., 2009) e a produzida por *Termitomyces clypeatus* apresentou maior atividade a 45 ºC (MAJUMDER; BANIK; KHOWALA, 2015). Na literatura foram encontrados estudos de peptidases com diferentes temperaturas ótimas

com variação entre 35 ºC e 75 ºC, assim as características da enzima produzida pelo fungo *Eupenicillium javanicum* corroborou com o que já foi descrito.

Apesar da determinação da temperatura ótima aparente ser um parâmetro bioquímico de enzima muito importante, não reflete quanto a enzima suporta a exposição a determinados tempos e temperaturas. Desta maneira, foram realizados ensaios de estabilidade térmica da enzima secretada pelo fungo *E. javanicum* e foi observado uma manutenção da atividade residual cerca de 80 %, na faixa de 30 a 60 ºC, após 60 minutos de exposição (Figura 10).

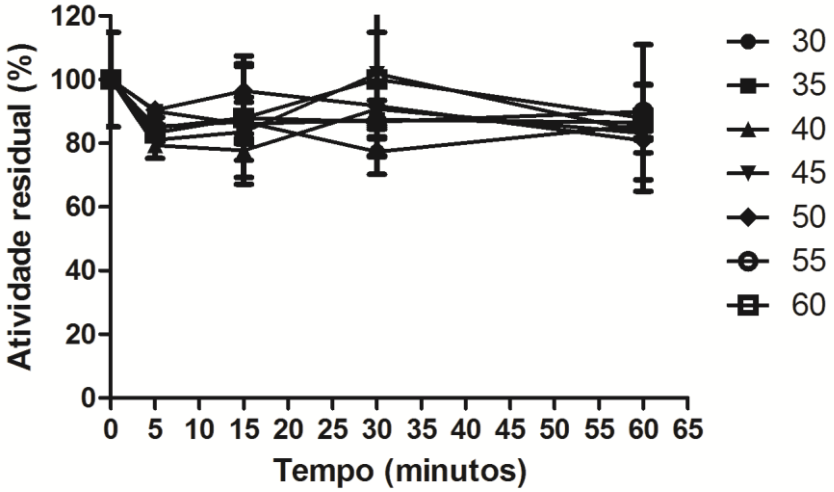

Figura 10. Estabilidade da peptidase isolada do bioprocesso submerso do fungo *Eupenicillium javanicum*, frente à exposição a diferentes temperaturas e tempos. A atividade proteolítica foi determinada em triplicata com substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp a 55 °C, pH 6,0.

A peptidase produzida pelo fungo *Penicillium italicum* apresentou estabilidade térmica semelhante, sendo capaz de manter cerca de 80 % da sua atividade a 40 ºC e 50 ºC, porém manteve apenas 60 % da sua atividade a 60 °C após 60 minutos de exposição (ABIDI et al., 2014). A atividade residual da peptidase produzida por *Boritrys cinerea* manteve apenas 10 % de sua atividade a 60 °C, após 60 minutos de exposição (ABIDI et

al., 2011) as peptidases produzidas pelos fungos *Graphium Putredinis* e *Trichoderma harzianum* não se mostraram estáveis a 60 ºC após 15 minutos de exposição (SAVITHA et al., 2011). Uma metalopeptidase secretada por *Microbacterium* sp apresentou comportamento semelhante a enzima do fungo *E. javanicum*, a peptidase manteve mais que 80 % de sua atividade a 55 °C e cerca de 70 % a 60 °C após 60 min de exposição (THYS; BRANDELLI, 2006). A enzima isolada do bioprocesso submerso do fungo *Eupenicillium javanicum* se mostrou mais termoestável do que algumas peptidases de origem microbiana, característica que a torna interessante para aplicações futuras.

4.1.2.3. Efeito de sais na atividade proteolítica da enzima secretada pelo fungo *Eupenicillium javanicum*

Algumas peptidases, especialmente metalopeptidases, podem ser influenciadas em sua atividade quando expostas a íons metálicos. Estas alterações podem ser consideradas como modulação positiva ou negativa, que correspondente ao aumento ou diminuição da atividade, respectivamente. A pré-incubação da enzima com 5 mM de manganês, magnésio, bário, potássio, lítio ou cálcio apresentou uma modulação positiva. Por outro lado, na presença de cobre, alumínio, zinco ou níquel, a peptidase apresentou uma modulação negativa com aproximadamente 4, 4, 30 e 50 % de atividade residual, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2. Influência de íons metálicos sobre a atividade proteolítica da peptidase isolada do bioprocesso submerso do fungo *Eupenicillium javanicum*. O ensaio foi determinado em triplicata na presença do substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp a 55 °C, em pH 6,0, a concentração final dos íons foi de 5 mM.

Ìons metálicos	Atividade residual (%)
Controle	100,0 ± 2,52
Sódio	98,0 ± 3,25
Cobre	3,6 ± 2,57
Zinco	30,0 ± 0,09
Manganês	108,7 ± 4,24
Magnésio	107,5 ± 4,69
Bário	110,2 ± 8,08
Alumínio	3,9 ± 0,33
Potássio	108,0 ± 6,44
Lítio	109,2 ± 2,81
Níquel	50,3 ± 8,03
Cobalto	100,8 ± 15,47
Cálcio	108,6 ± 3,31

Os valores foram apresentados como média ± desvio padrão.

A pré-incubação de outras peptidases produzidas pelos microrganismos *Penicillium digitatum* (AISSAOUI et al., 2014), *Penicillium italicum* (ABIDI et al., 2014), *Myceliophthora* sp (ZANPHORLIN et al., 2011), *Graphium Putredinis* e *Trichoderma harzianum* (SAVITHA et al., 2011) com zinco influenciou negativamente na atividade proteolítica. Peptidases isoladas de bioprocessos dos fungos *Penicillium waksmanii* (GRAMINHO et al., 2013) e *Aspergillus oryzae* KSK-3 (SHIRASAKA et al., 2012) apresentaram menor atividade residual na presença de alumínio. A peptidase

produzida pelo *Myceliophthora* sp (ZANPHORLIN et al., 2011), sofreu modulação negativa na presença de níquel e cobre. As peptidases produzidas pelos microrganismos *Aspergillius niger* (DEVI et al., 2008), *Bacillus alcalophillus* TCCC11004 (CHENG et al., 2010) e *Planomicrobium* sp L-2 (LIU et al., 2013) apresentaram modulação negativa na presença de cobre. De acordo com outros autores (RIGO et al., 2004), o íon cobre pode oxidar as cisteínas, e transforma-las em cistinas, esta modificação pode dificultar o acesso ao sítio ativo, consequentemente o que pode influenciar a atividade proteolítica.

4.1.2.4. Efeito de inibidores na atividade proteolítica da enzima secretada pelo fungo *Eupenicillium javanicum*

As peptidases são classificadas de acordo com, sequência de amino ácidos, pH e presença de determinados resíduos de amino ácidos em seu sítio catalítico, sendo que esta última é a forma mais usual de classificar as peptidases. Alguns inibidores são utilizados para classificar peptidases quanto ao sítio catalítico, a atividade proteolítica de metalopeptidases está relacionada à presença de íons metálicos no sítio catalítico ou a sua estrutura, a quelação destes íons tem como consequência a inibição da atividade desta classe de peptidase. O EDTA é um agente quelante de metais e sua pré-incubação com a enzima produzida pelo fungo *E. javanicum* promoveu queda na atividade proteolítica da enzima (Tabela 3), desta maneira, podemos inferir que a peptidase pertencente à classe de metalopeptidases.

Tabela 3. Influência de inibidores sobre a atividade proteolítica de peptidase purificada do extrato enzimático produzido pelo fungo *Eupenicillium javanicum* sob bioprocesso submerso. O ensaio foi determinado em triplicata na presença do substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp a 55°C, em pH 6,0, a concentração final dos inibidores foi de 5 mM.

Inibidores	Atividade residual (%)
Controle	100,0 ± 7,94
EDTA	2,7 ± 0,47
Àcido iodo acético	72,3 ± 1,72
PMSF	94,2 ± 12,95

Os valores foram apresentados como média ± desvio padrão.

4.1.2.5. Efeito de surfactantes na atividade proteolítica da enzima secretada pelo fungo *Eupenicillium javanicum*

Alguns pré-requisitos para a utilização de peptidases nas indústrias de detergentes são atividade e estabilidade em níveis de pH alcalino e de temperaturas elevadas, além da compatibilidade com alguns agentes quelantes e oxidantes que são adicionados na formulação de detergentes (RANI; RANA; DATT, 2012). Estes detergentes ou surfactantes podem causar um transtorno nas interações hidrofóbicas na estrutura da proteína e, consequentemente, influenciar a atividade proteolítica. A peptidase isolada do bioprocesso do fungo *Eupenicillium javanicum* apresentou estabilidade frente as diferentes concentrações de Triton™ X-100 e Tween® 20, mantendo cerca de 100 e 75 % de sua atividade na concentração de 1 % destes surfactantes, respectivamente (Figura 11).

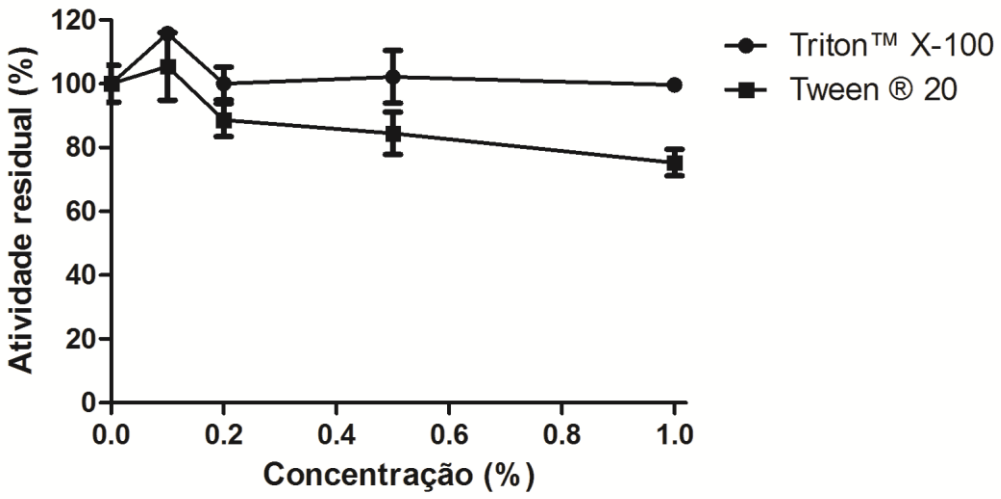

Figura 11. Influência dos surfactantes Triton™ X-100 e Tween ® 20 sobre a atividade proteolítica da peptidase isolada do bioprocesso submerso do fungo *Eupenicillium javanicum*. O ensaio foi determinado em triplicata na presença do substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp a 55 °C, em pH 6,0.

A enzima produzida por *Penicillium digitatum* manteve cerca de 63 % da sua atividade em presença de 5 % de Tween ® 20 (AISSAOUI et al., 2014). A peptidase produzida por *Penicillium waksmanii* apresentou atividade residual de 43 % em presença de 0,8 % de Tween ® 80 (GRAMINHO et al., 2013). Por outro lado, a enzima isolada do bioprocesso do fungo *Myceliophthora* sp apresentou uma modulação positiva em sua atividade em 1 % de Tween ® 20 com cerca de 117 % de atividade (ZANPHORLIN et al., 2011).

A peptidase produzida pelo fungo *Penicillium digitatum* manteve cerca de 70 % de sua atividade na presença de Triton™ X-100 (AISSAOUI et al., 2014). Por outro lado, a enzima produzida pelo fungo *Thermoascus aurantiacus* na presença de Triton™ X-100 não apresentou atividade (MERHEB-DINI et al., 2009). Peptidases produzidas por *Penicillium waksmanii* manteve cerca de 43 % de atividade residual em 0,8 % de Triton™ X-100 (GRAMINHO et al., 2013), a peptidase produzida pelo fungo *Eupenicillium*

javanicum apresentou maior estabilidade frente ao Triton™ X-100 do que algumas enzimas citadas na literatura.

Outros surfactantes testados, CTAB e SDS, promoveram uma queda de atividade com o aumento de suas concentrações, a peptidase manteve cerca de 63 e 41 % da atividade em 0,02 % de CTAB e SDS, respectivamente. A partir da concentração 0,06 % destes surfactantes a atividade proteolítica foi praticamente nula (Figura 12).

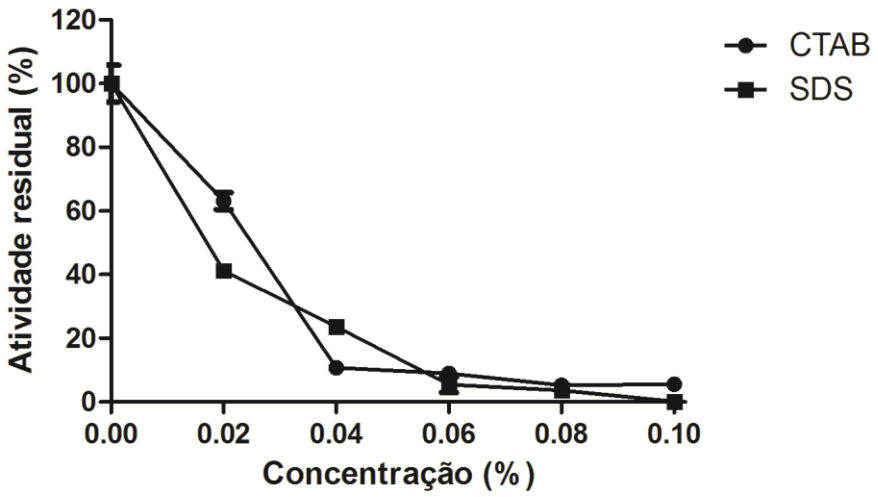

Figura 12. Influência dos surfactantes CTAB e SDS sobre a atividade proteolítica da peptidase isolada do bioprocesso submerso do fungo *Eupenicillium javanicum*. O ensaio foi determinado em triplicata na presença do substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp a 55 °C, em pH 6,0.

Algumas peptidases apresentaram atividade proteolítica em presença de SDS, como as secretadas pelos fungos *Penicillium waksmanii* (GRAMINHO et al., 2013) e *Myceliophthora* sp (ZANPHORLIN et al., 2011). A peptidase produzida por *Botrytis cinerea* apresentou estabilidade em 1 % de SDS, com aproximadamente 74 % de atividade residual (ABIDI et al., 2011).

4.1.2.6. Efeito de ureia, guanidina e ditiotretiol (DTT) na atividade proteolítica da enzima secretada pelo fungo *Eupenicillium javanicum*

O efeito de agentes redutores, como o DTT, podem promover a quebra de pontes dissulfeto e também reduzir grupos sulfidrilas. A estrutura terciária de proteínas depende da manutenção das pontes dissulfeto (VIEILLE; ZEIKUS, 2001). A peptidase produzida pelo fungo *E. javanicum* apresentou queda de atividade proteolítica na presença de DTT, este comportamento é indicativo do rompimento de pontes dissulfeto, promovendo a desnaturação da peptidase, efeito observado em todas concentrações testadas (Figura 13). Resultados semelhantes foram observados para peptidases do fungo *Thermoascus aurantiacus*, a qual apresentou queda de atividade com o aumento da concentração de DTT (MERHEB-DINI et al., 2009). A enzima produzida por *Penicillium waksmanii* manteve 15 % de sua atividade com 20 mM de DTT (GRAMINHO et al., 2013), estabilidade inferior da enzima do *E. javanicum*, a qual manteve 38 % de sua atividade em 25 mM de DTT.

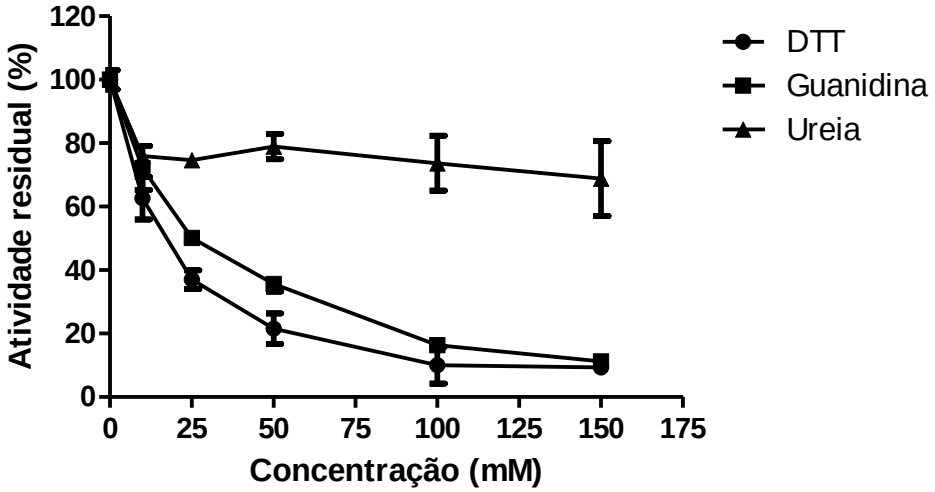

Figura 13. Influência das substâncias DTT, guanidina e ureia, sobre a atividade proteolítica da peptidase isolada do bioprocesso submerso do fungo *Eupenicillium javanicum*. O ensaio foi determinado em triplicata na presença do substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp a 55 °C, em pH 6,0.

As pontes de hidrogénio auxiliam a manter a estrutura de proteínas, agentes caotrópicos, como a ureia e guanidina podem promover desordens nestas interações e induzir alterações na conformação da proteína (ADRIO; DEMAIN, 2014), estas alterações podem influenciar na atividade proteolítica. Em todas as concentrações de ureia testadas, a enzima manteve cerca de 80 % ou mais de sua atividade. Estudos realizados por outros autores também avaliaram o efeito da ureia sobre a atividade proteolítica, a enzima manteve 40 % da atividade em 0,1 M (GRAMINHO et al., 2013). A guanidina apresentou um efeito maior sobre a desnaturação da enzima, comportamento semelhante ao do DTT, porém na concentração de 25 mM de guanidina, a peptidase manteve cerca de 50 % de atividade residual. Desta maneira, cada enzima apresenta uma particularidade em sua estrutura, a qual influencia diretamente na atividade proteolítica.

4.1.3. Estudos de cinética da enzima secretada pelo fungo *E. javanicum* utilizando substrato peptídico sintético com supressão intramolecular de fluorescência

O estudo dos ensaios cinéticos permite determinar a especificidade da peptidase para alguns substratos e, consequentemente, auxilia a inferir uma aplicação para a enzima. A Tabela 4 mostra os valores dos parâmetros cinéticos da enzima em relação aos subsítios S_1, S_2 e S_3 quanto à substituição de aminoácidos nas posições P_1, P_2 e P_3 do substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnP (padrão). Com base nos dados, podemos observar que alguns substratos, na posição P_1, não foram hidrolisados, por outro lado, na presença de lisina e arginina, os valores de eficiência catalítica da enzima foram mais pronunciados, 311,1, 212,1 $mM^{-1}.seg^{-1}$, respectivamente. Os aminoácidos que propiciaram maior eficiência catalítica são semelhantes quanto a presença de cadeia lateral alifática longa e característica básica.

A substituição de alanina e glutamina na posição P_1 resultou em baixa eficiência catalítica. A enzima mostrou preferência por aminoácidos polares básicos nesta posição, o que mostra certa especificidade da peptidase para alguns tipos de aminoácidos na posição P_1 do substrato Abz-KL**X**SSKQ-EDDnp. A enzima apresentou maior afinidade pelo substrato contendo valina, com valor de K_M de 0,0062 mM.

Os parâmetros cinéticos para o subsítio S_2 mostraram que os maiores valores de eficiência catalítica foram com substratos contendo tirosina, arginina e leucina, com valores de 201,7, 178,2 e 177,8 $mM^{-1}.seg^{-1}$, respectivamente. Estes aminoácidos não possuem características físico-químicas semelhantes, além disso, a enzima não clivou os substratos com ácido aspártico e glicina. Assim podemos inferir que o subsítio S_2 é

generalista quanto ao tipo de aminoácido na posição equivalente no substrato. O menor valor de K_M foi na presença de asparagina, 0,019 mM.

A enzima apresentou maior eficiência catalítica com isoleucina e valina na posição P_3, com 417,0 e 271,0 $mM^{-1}.seg^{-1}$, respectivamente, estes aminoácidos apresentam como semelhança o caráter apolar. A isoleucina além de propiciar maior eficiência catalítica, apresentou menor valor de K_M, quanto menor valor deste parâmetro maior afinidade da enzima pelo substrato. Todos os substratos ensaiados nesta posição apresentaram clivagem, entretanto a enzima apresentou baixo valor de eficiência catalítica para o substrato contendo tirosina, quando comparado com os outros resíduos de aminoácidos.

Em geral, a análise de substituições de aminoácidos nas posições P_1, P_2 e P_3, no substrato padrão, não apresentaram semelhanças. Substituições na posição P_3 apresentaram os maiores valores de eficiência catalítica, com destaque para a isoleucina, indicando que o subsítio S_3 é o que influência a hidrólise do substrato, quando se analisa apenas os subsítios do lado ¨S¨.

Tabela 4. Determinação dos parâmetros cinéticos dos subsítios (S_1, S_2 e S_3), da peptidase isolado do bioprocesso do fungo *Eupenicillium javanicum*. O ensaio foi conduzido em duplicata com substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp e substituições nas posições (P_1, P_2 e P_3), a 55 ºC e pH 6,0.

Substrato série P_1	**k_{cat}(s)**	**K_M (mM)**	**k_{cat}/K_M($mM^{-1}.s^{-1}$)**
Abz-KL**R**SSKQ-EDDnp	4,75	0,0224	212,1 ± 6,8
Abz-KL**K**SSKQ-EDDnp	15,40	0,0495	311,1 ± 13,1
Abz-KL**F**SSKQ-EDDnp	3,37	0,0251	134,3 ± 8,7
Abz-KL**L**SSKQ-EDDnp	2,82	0,0221	127,6 ± 5,4
Abz-KL**Y**SSKQ-EDDnp	2,84	0,0287	99,0 ± 0,2
Abz-KL**M**SSKQ-EDDnp	2,23	0,0273	81,7 ± 9,7

Abz-KL**H**SSKQ-EDDnp	1,61	0,0383	42,0 ± 2,3
Abz-KL**N**SSKQ-EDDnp	1,45	0,0505	28,7 ± 1,5
Abz-KL**V**SSKQ-EDDnp	0,17	0,0062	27,4 ± 16,6
Abz-KL**A**SSKQ-EDDnp	1,35	0,0490	27,6 ± 2,4
Abz-KL**Q**SSKQ-EDDnp	0,63	0,0293	21,5 ± 2,8
Abz-KL**T**SSKQ-EDDnp		Não hidrolisa	
Abz-KL**S**SSKQ-EDDnp		Não hidrolisa	
Abz-KL**W**SSKQ-EDDnp		Não hidrolisa	
Abz-KL**I**SSKQ-EDDnp		Não hidrolisa	
Abz-KL**E**SSKQ-EDDnp		Não hidrolisa	
Abz-KL**D**SSKQ-EDDnp		Não hidrolisa	
Abz-KL**P**SSKQ-EDDnp		Não hidrolisa	

Substrato série P_2	**k_{cat}(s)**	**K_M (mM)**	**k_{cat}/K_M($mM^{-1}. s^{-1}$)**
Abz-KL**R**SSKQ-EDDnp	4,75	0,0224	212,1 ± 6,8
Abz-K**Y**RSSKQ-EDDnp	8,35	0,0414	201,7 ± 1,2
Abz-K**R**RSSKQ-EDDnp	7,70	0,0432	178,2 ± 18,1
Abz-K**K**RSSKQ-EDDnp	5,78	0,0325	177,8 ± 1,4
Abz-K**F**RSSKQ-EDDnp	4,00	0,0273	146,5 ± 0,8
Abz-K**M**RSSKQ-EDDnp	7,62	0,0526	144,9 ± 10,4
Abz-K**V**RSSKQ-EDDnp	8,94	0,0690	129,6 ± 1,4
Abz-K**I**RSSKQ-EDDnp	4,12	0,0324	127,2 ± 8,7
Abz-K**A**RSSKQ-EDDnp	5,56	0,0438	126,9 ± 13,9
Abz-K**P**RSSKQ-EDDnp	3,93	0,0428	91,8 ± 10,8
Abz-K**Q**RSSKQ-EDDnp	2,67	0,0504	53,0 ± 1,0

Abz-K**H**RSSKQ-EDDnp	2,95	0,0608	48,5 ± 1,2
Abz-K**N**RSSKQ-EDDnp	0,79	0,0190	41,6 ± 10,7
Abz-K**S**RSSKQ-EDDnp	2,51	0,0789	31,8 ± 0,1
Abz-K**T**RSSKQ-EDDnp	1,12	0,0453	24,7 ± 0,9
Abz-K**E**RSSKQ-EDDnp	1,11	0,0605	18,3 ± 1,3
Abz-K**W**RSSKQ-EDDnp	0,46	0,0328	14,0 ± 0,5
Abz-K**D**RSSKQ-EDDnp	Não hidrolisa		
Abz-K**G**RSSKQ-EDDnp	Não hidrolisa		

Substrato série P_3	**k_{cat}(s)**	**K_M (mM)**	**k_{cat}/K_M($mM^{-1}. s^{-1}$)**
Abz-KL**R**SSKQ-EDDnp	4,75	0,0224	212,6 ± 6,8
Abz-**I**LRSSKQ-EDDnp	6,88	0,0165	417,0 ± 50,7
Abz-**V**LRSSKQ-EDDnp	6,44	0,0237	271,7 ± 13,3
Abz-**H**LRSSKQ-EDDnp	8,26	0,0361	228,8 ± 9,6
Abz-**L**LRSSKQ-EDDnp	5,61	0,0296	189,5 ± 10,2
Abz-**R**LRSSKQ-EDDnp	3,61	0,0201	179,6 ± 19,9
Abz-**F**LRSSKQ-EDDnp	4,95	0,0328	150,9 ± 1,7
Abz-**A**LRSSKQ-EDDnp	4,93	0,0363	135,8 ± 0,6
Abz-**M**LRSSKQ-EDDnp	5,64	0,0475	118,7 ± 1,1
Abz-**S**LRSSKQ-EDDnp	4,82	0,0520	92,7 ± 3,6
Abz-**E**LRSSKQ-EDDnp	3,42	0,0437	78,3 ± 1,8
Abz-**D**LRSSKQ-EDDnp	3,36	0,0470	71,5 ± 2,5
Abz-**Q**LRSSKQ-EDDnp	2,77	0,0408	67,9 ± 0,5
Abz-**W**LRSSKQ-EDDnp	1,44	0,0328	43,9 ± 5,9
Abz-**N**LRSSKQ-EDDnp	3,92	0,0911	43,0 ± 2,3
Abz-**Y**LRSSKQ-EDDnp	4,51	0,2039	22,1 ± 1,2

Os valores foram apresentados como média ± desvio padrão.

A Tabela 5 apresenta os valores dos parâmetros cinéticos da peptidase quanto aos subsítios S'_1, S'_2 e S'_3 em relação a substituições nas posições P'_1, P'_2 e P'_3 do substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp. Analisando os dados, podemos observar que a enzima apresentou maior eficiência catalítica com o substrato que contém tirosina, 9469,7 $mM^{-1}.seg^{-1}$, seguido pelo substrato contendo fenilalanina com 7100,0 $mM^{-1}.seg^{-1}$, ambos possuem anel aromático na cadeia lateral, porém com características físico-químicas polar e apolar, respectivamente. A peptidase foi capaz de clivar todos os substratos com mudanças na posição P'_1, entretanto com baixos valores de eficiência catalítica para o substrato contendo ácido aspártico. A peptidase apresentou certa especificidade para substratos que possuem anel aromático na cadeia lateral. Quanto à afinidade, o substrato contendo fenilalanina foi o que apresentou menor K_M, 0,0014 mM.

Os parâmetros cinéticos da peptidase para o subsítio S'_2 foram mais pronunciados com a presença de metionina e tirosina, com eficiência catalítica de 936,4 e 685,9 $mM^{-1}.seg^{-1}$, respectivamente. Este subsítio mostrou baixa especificidade, já que não houve semelhança entre os substratos que proporcionaram maiores valores de eficiência catalítica. Os substratos que continham glicina e prolina apresentaram menores valores de eficiência catalítica. O menor valor de K_M foi estimado para o substrato que possuía leucina, com 0,0059 mM.

O subsítio S'_3 apresentou maior valor de eficiência catalítica para tirosina e fenilalanina, 207,4 e 178,7 $mM^{-1}.seg^{-1}$, respectivamente, ambos com anel aromático em suas cadeias laterais. Os substratos contendo asparagina, ácido glutâmico, valina e prolina apresentaram as menores taxas de hidrólise. O menor valor de K_M foi para o substrato contendo metionina, com 0,0146 mM.

Tabela 5. Determinação dos parâmetros cinéticos dos subsítios (S'_1, S'_2 e S'_3), da peptidase isolada do bioprocesso submerso do fungo *Eupenicillium javanicum*. O ensaio foi conduzido em duplicata com substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp e substituições nas posições (P'_1, P'_2 e P'_3), a 55 ºC e pH 6,0.

Substrato série P'_1	**k_{cat}(s)**	**K_M (mM)**	**k_{cat}/K_M($mM^{-1}.s^{-1}$)**
Abz-KL**R**SSKQ-EDDnp	4,75	0,0224	212,1 ± 6,8
Abz-KLR**Y**SKQ-EDDnp	84,28	0,0089	9469,7 ± 169,4
Abz-KLR**F**SKQ-EDDnp	9,94	0,0014	7100,0 ± 557,3
Abz-KLR**A**SKQ-EDDnp	29,85	0,0062	4814,5 ± 703,4
Abz-KLR**M**SKQ-EDDnp	40,00	0,0189	2116,4 ± 1,4
Abz-KLR**R**SKQ-EDDnp	52,14	0,0309	1687,4 ± 37,4
Abz-KLR**W**SKQ-EDDnp	43,85	0,0407	1077,4 ± 68,2
Abz-KLR**H**SKQ-EDDnp	50,00	0,0497	1006,0 ± 133,3
Abz-KLR**K**SKQ-EDDnp	67,10	0,0702	955,8 ± 31,8
Abz-KLR**I**SKQ-EDDnp	14,71	0,0167	880,8 ± 25,7
Abz-KLR**L**SKQ-EDDnp	16,17	0,0223	725,1 ± 39,2
Abz-KLR**V**SKQ-EDDnp	7,38	0,0243	303,7 ± 26,3
Abz-KLR**P**SKQ-EDDnp	8,36	0,0327	255,7 ± 9,5
Abz-KLR**N**SKQ-EDDnp	5,17	0,0243	212,8 ± 5,9
Abz-KLR**T**SKQ-EDDnp	9,58	0,0473	202,5 ± 4,0
Abz-KLR**Q**SKQ-EDDnp	19,49	0,1178	165,4 ± 16,1
Abz-KLR**E**SKQ-EDDnp	2,06	0,0267	77,2 ± 2,1
Abz-KLR**D**SKQ-EDDnp	2,19	0,0544	40,3 ± 10,0
Substrato série P'_2	**k_{cat}(s)**	**K_M (mM)**	**k_{cat}/K_M($mM^{-1}.s^{-1}$)**
Abz-KL**R**SSKQ-EDDnp	4,75	0,0224	212,1 ± 6,8
Abz-KLRS**M**KQ-EDDnp	11,33	0,0121	936,4 ± 186,2

Abz-KLRS**Y**KQ-EDDnp	5,35	0,0078	685,9	± 69,1
Abz-KLRS**L**KQ-EDDnp	3,67	0,0059	622,0	± 40,1
Abz-KLRS**R**KQ-EDDnp	7,03	0,0133	528,6	± 31,2
Abz-KLRS**K**KQ-EDDnp	4,93	0,0131	376,3	± 27,2
Abz-KLRS**A**KQ-EDDnp	10,65	0,0310	343,5	± 2,2
Abz-KLRS**V**KQ-EDDnp	5,85	0,0179	326,8	± 31,4
Abz-KLRS**F**KQ-EDDnp	2,63	0,0087	302,3	± 0,2
Abz-KLRS**I**KQ-EDDnp	2,15	0,0075	286,7	± 27,2
Abz-KLRS**W**KQ-EDDnp	4,44	0,0179	248,0	± 2,3
Abz-KLRS**H**KQ-EDDnp	5,24	0,0350	149,7	± 25,3
Abz-KLRS**T**KQ-EDDnp	4,81	0,0359	134,0	± 10,5
Abz-KLRS**N**KQ-EDDnp	3,33	0,0308	108,1	± 3,2
Abz-KLRS**Q**KQ-EDDnp	5,68	0,0619	91,8	± 3,7
Abz-KLRS**E**KQ-EDDnp	3,16	0,0391	80,8	± 7,8
Abz-KLRS**D**KQ-EDDnp	4,23	0,0675	62,7	± 8,5
Abz-KLRS**G**KQ-EDDnp	0,99	0,0466	21,2	± 3,5
Abz-KLRS**P**KQ-EDDnp	0,83	0,0546	15,2	± 3,2

Substrato série P'3	**k_{cat}(s)**	**K_M (mM)**	**k_{cat}/K_M($mM^{-1}.s^{-1}$)**	
Abz-KL**R**SSKQ-EDDnp	4,75	0,0224	212,1	± 6,8
Abz-KLRSS**Y**Q-EDDnp	6,16	0,0297	207,4	±20,8
Abz-KLRSS**F**Q-EDDnp	4,02	0,0225	178,7	±10,2
Abz-KLRSS**I**Q-EDDnp	5,40	0,0396	136,4	±8,4
Abz-KLRSS**R**Q-EDDnp	5,42	0,0426	127,2	±7,2
Abz-KLRSS**M**Q-EDDnp	33,18	0,3146	105,5	±4,0
Abz-KLRSS**L**Q-EDDnp	2,12	0,0216	98,1	±6,8

Abz-KLRSS**K**Q-EDDnp	6,12	0,0636	96,2	±2,9
Abz-KLRSS**W**Q-EDDnp	3,02	0,0347	87,0	±4,5
Abz-KLRSS**H**Q-EDDnp	1,80	0,0398	45,2	±1,9
Abz-KLRSS**T**Q-EDDnp	0,52	0,0147	35,4	±4,7
Abz-KLRSS**Q**Q-EDDnp	2,06	0,0598	34,4	±2,5
Abz-KLRSS**A**Q-EDDnp	1,43	0,0433	33,0	±1,9
Abz-KLRSS**S**Q-EDDnp	4,15	0,1399	29,7	±0,9
Abz-KLRSS**G**Q-EDDnp	1,62	0,0555	29,2	±3,0
Abz-KLRSS**D**Q-EDDnp	1,02	0,0436	23,4	±2,0
Abz-KLRSS**N**Q-EDDnp	1,00	0,0561	17,8	±2,4
Abz-KLRSS**E**Q-EDDnp	0,72	0,0490	14,7	±0,7
Abz-KLRSS**V**Q-EDDnp	4,01	0,2992	13,4	±0,6
Abz-KLRSS**P**Q-EDDnp	1,10	0,0941	11,7	±0,8

Os valores foram apresentados como média ± desvio padrão.

De maneira geral, o subsítio “S” hidrolisou todos os substratos testados e apresentou os maiores valores de eficiência catalítica, destacando-se a tirosina, que apresentou o maior valor de eficiência catalítica na posição P'_1.

As peptidases produzidas por *Penicillium waksmanii* (GRAMINHO et al., 2013) e *Myceliophthora* sp (ZANPHORLIN et al., 2011) e *Aspergillus fumigatus* Fresenius (DA SILVA et al., 2014) mostraram similaridades quanto a preferência dos subsítios (não linha) a substratos com resíduos de aminoácidos não carregados nas posições equivalentes, entretanto, o subsítio S_2 foi o qual mais influenciou a eficiência catalítica na primeira enzima, e o subsítio S_1 na segunda enzima, ambos com isoleucina nas

posições equivalentes do substrato. No caso da terceira enzima, o subsítio que apresentou maior influência na hidrólise do substrato foi o S'_3 com leucina na posição P'_3.

4.2. *Myceliophthora thermophila*: bioprocesso em meio submerso

A produção de peptidase pelo fungo *M. thermophila* foi realizada por bioprocesso submerso em meio com pH inicial 5,0, a 45 °C, 120 rpm e 48 horas. Foram produzidas 282551 UA de peptidases.

4.2.1. Purificação da enzima secretada pelo fungo *Myceliophthora thermophila*

Os processos cromatográficos podem variar de acordo com as características físico químicas, mediante a isto, cada enzima pode apresentar uma estratégia diferente de purificação. O extrato enzimático do fungo *Myceliophtora thermophila* foi aplicado em uma cromatografia de troca iônica, seguida de uma cromatografia de interação hidrofóbica, o rendimento obtido foi de 37 % e a taxa de purificação de 189 vezes, (Tabela 6).

A Figura 14 mostra o perfil de eluição da amostra submetida à cromatografia de troca iônica em resina Source 15Q. A enzima não interagiu com a resina, sendo eluida na fração I (5 a 20 mL), entretanto, foi possível a separação de outras moléculas (picos II, III, IV e V), as quais foram retidas na resina e eluídas durante o gradiente salino. As frações com atividade proteolítica foram reunidas e aplicadas na resina de interação hidrofóbica (fenil sepharose), da qual foram eluidos 3 picos com moléculas com absorção em 280 nm, sendo que o pico III (16 a 21 mL) apresentou atividade proteolítica (Figura 15).

A amostra referente a este pico enzimático foi submetida a uma eletroforese SDS-PAGE a 12 %, (Figura 16). Analisando o gel, certificamos a pureza da peptidase através da presença de banda única, e estimamos a massa molecular em 36,2 kDa. Outros autores purificaram serino peptidases, a enzima isolada por Graminho et al. (2013) do extrato enzimático produzido pelo fungo *Penicillium waksmanii* teve sua massa molecular estimada em 32 kDa. Shankar, Rao e Laxman (2011), também produziram uma serino peptidase por bioprocesso submerso, entretanto com o fungo *Beauveria* sp, a enzima apresentou massa molecular de 29 kDa, com recuperação cerca de 38 %, e taxa de purificação de 10 vezes. Zanphorlin et al. (2011) relataram que o fungo *Myceliophtora* sp submetido a bioprocesso em meio sólido produz uma serino peptidase de 28,2 kDa, o processo de purificação apresentou rendimento de 51,5 % e a taxa de purificação de 128,3 vezes, valores considerados ótimos comparado com o que há descrito na literatura, porém o bioprocesso foi em estado sólido o que não o torna atraente para a estrapolação para a produção em alta escala.

Tabela 6. Etapas de purificação da peptidase produzida pelo fungo *Myceliophtora thermophila* pelo bioprocesso submerso, com pH inicial 5,0, durante 48 horas a 45 °C, a 120 rpm.

Etapa	**Unidades Totais (U)**	**Proteínas Totais (mg)**	**Atividade Específica (U/mg)**	**Rendimento (%)**	**Taxa de purificação**
Extrato	282551	6594	43	100	1
Source 15Q	183261	301	609	65	14
Fenil	105486	13	8114	37	189

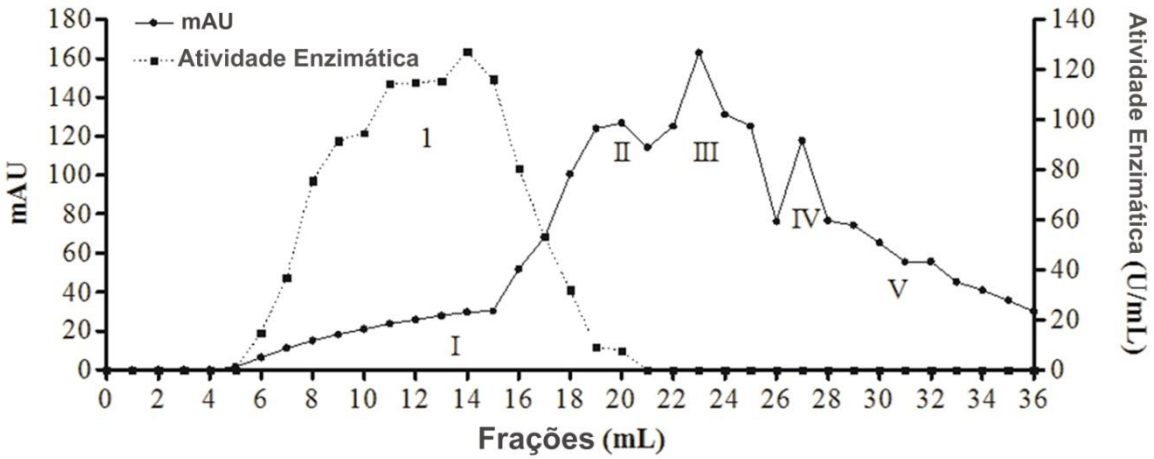

Figura 14. Perfil de eluição do processo cromatográfico do extrato bruto produzido por bioprocesso submerso pelo fungo *Myceliophtora thermophila*, utilizando a resina Source 15Q (aniônica), com gradiente salino de 0 a 150 mM de NaCl, em tampão tris-HCl 50 mM, pH 8,0. A vazão foi mantida em 0,3 mL/min e foram coletadas frações de 1 mL.

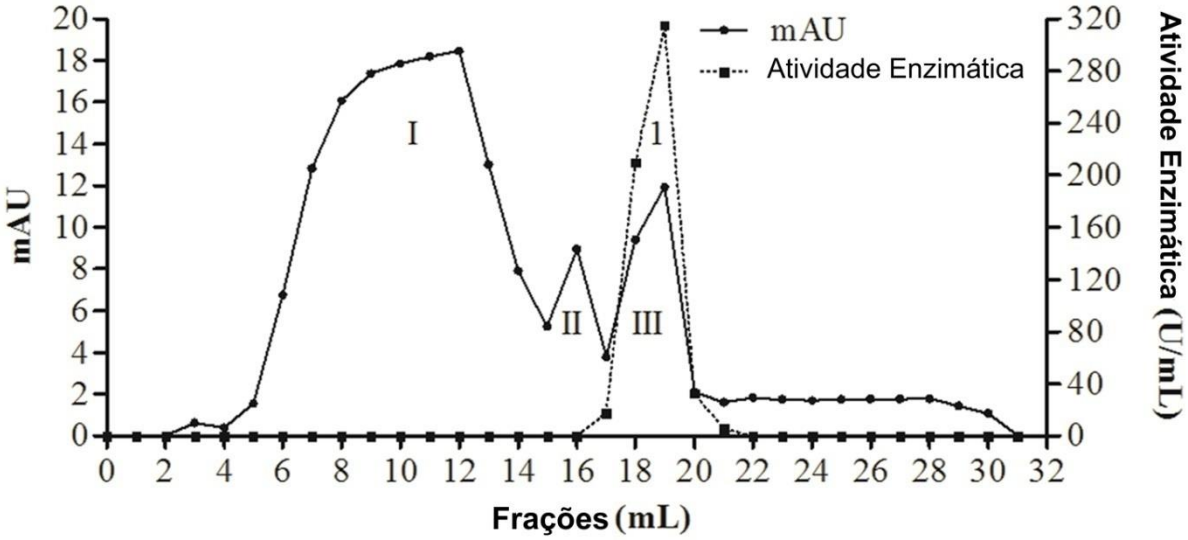

Figura 15. Perfil de eluição do processo cromatográfico proveniente das proteínas obtidas da cromatografia em resina Source 15Q. A resina utilizada foi fenil sepharose, a eluição em gradiente de dessalinização de 750 a 0 mM de sulfato de amônio em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0. A vazão foi mantida em 0,3 mL/min e foram coletadas frações de 1 mL.

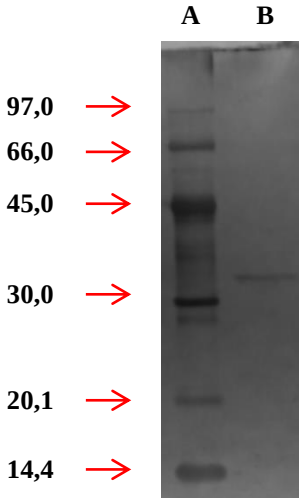

Figura 16. Imagem do gel SDS-PAGE 12 %, corado com nitrato de prata da peptidase isolada do bioprocesso submerso do fungo *Myceliophtora thermophila*, após processos cromatográficos. (A) marcador de baixa massa molecular (LMW-SDS Marker Kit – GE) e (B) peptidase purificada.

4.2.2. Ensaios de caracterização bioquímica da enzima secretada pelo fungo *Myceliophthora thermophila* utilizando substrato FRET

4.2.2.1. Efeito de pH: pH ótimo e estabilidade

A peptidase isolada do extrato enzimático do fungo *Myceliophtora thermophila* foi avaliada quanto sua atividade proteolítica em diferentes valores de pH. A peptidase apresentou o máximo de atividade em pH 6,5. Em pH 4,0, a peptidase apresentou a menor atividade proteolítica, com aumento progressivo até o pH 6,5, e em seguida, iniciou a queda da atividade, (Figura 17).

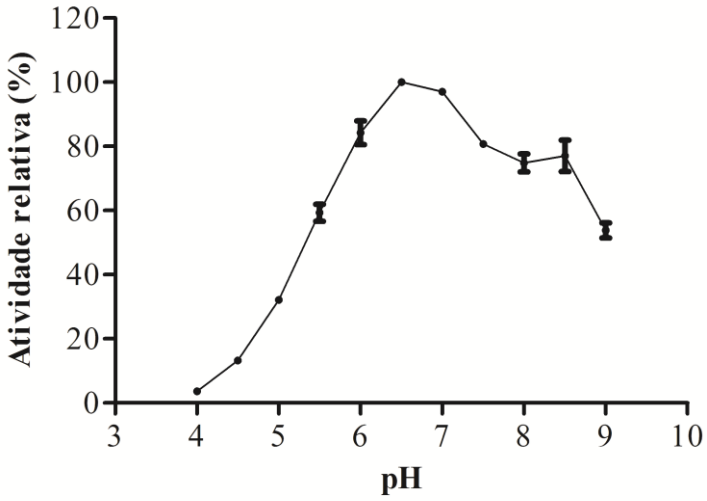

Figura 17. Influência dos diferentes valores de pH sobre a atividade proteolítica da peptidase isolada do bioprocesso submerso do fungo *Myceliophthora thermophila*. A atividade proteolítica foi determinada em triplicata com substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp a 45 °C.

Hernández-Martínez et al. (2011) observaram um comportamento similar da serino peptidase produzida em bioprocesso submerso pelo fungo *Aspergillus fumigattus*, a enzima apresentou atividade entre os valores de pH 6,0 e 9,0, além disso, a maior atividade proteolítica foi em 7,0. Wang, Wu e Liu (2007) relataram a produção de uma serino peptidase neutra em bioprocesso submerso pelo fungo *Hirsutella hossiliensis*, com atividade proteolítica na faixa de 6,0 a 8,0, sendo que a maior eficiência da enzima ocorreu em pH 7,0. Seong et al. (2004) também observaram atividade proteolítica da serino peptidase produzida por *Streptomyces tendae*, nesta mesma faixa de pH, sendo que o pH ótimo foi 6,0. Desta maneira, outros microrganismos são capazes de produzir peptidases com atividade na faixa de pH neutro.

A avaliação da estabilidade da enzima após 60 minutos exposta a diferentes níveis de pH (4,0 a 10,5) a 25 ºC mostrou que a peptidase é estável e manteve sua atividade enzimática em cerca de 70 % ou mais (Figura 18).

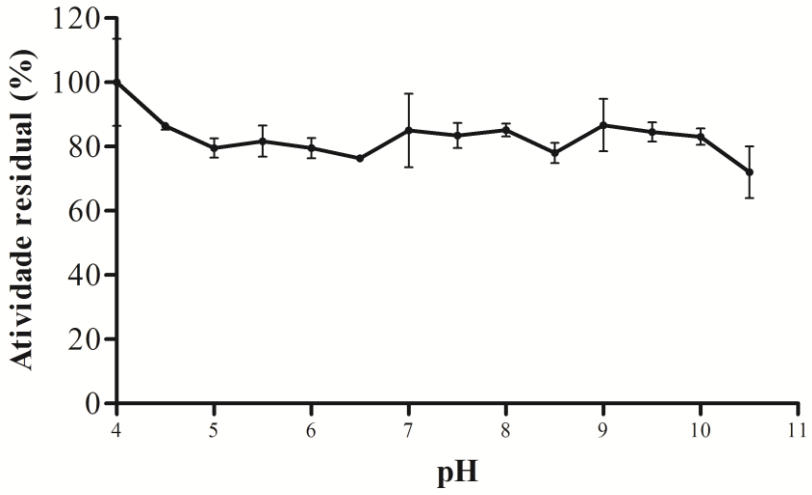

Figura 18. Estabilidade da peptidase isolada do bioprocesso submerso do fungo *Myceliophthora thermophila*, frente à exposição a diferentes valores de pH durante 60 minutos a 25 ºC. A atividade proteolítica foi determinada em triplicata com substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp a 45 °C, pH 6,5.

Outros microrganismos produzem serino peptidases com pH ótimo neutro, entretanto, com estabilidade inferior comparado com a enzima isolada do fungo *M. thermophila*. Hernández-Martínez et al. (2011) relataram manutenção de 50 % da atividade de uma peptidase na faixa de pH entre 7,0 e 11,0, enquanto que as produzidas por *Hirsutella rhossiliensis* mostraram estabilidade apenas na faixa entre 5,0 e 6,0 (WANG et al., 2007). Por outro lado, a peptidase produzida pelo microrganismo *Strptomyces tendae* e caracterizada por Seong et al. (2004), apresentou pH ótimo semelhante e estabilidade em ampla faixa de pH entre os valores de pH 4,0 e 9,0 após 60 minutos a 25 °C. A ampla estabilidade da enzima em diferentes valores de pH permite que a enzima possa ser aplicada em diferentes tipos de reação.

4.2.2.2. Efeito de temperatura: temperatura ótima e estabilidade

O ensaio de atividade enzimática em diferentes faixas de temperatura mostrou que a enzima apresenta maior atividade proteolítica em reações conduzidas a 45 ºC. Observando a Figura 19, entre 30 a 45 ºC a enzima atua praticamente com a mesma intensidade, após 45 ºC iniciou uma queda na atividade enzimática, sendo que a 70 ºC, 20 % de sua atividade é mantida.

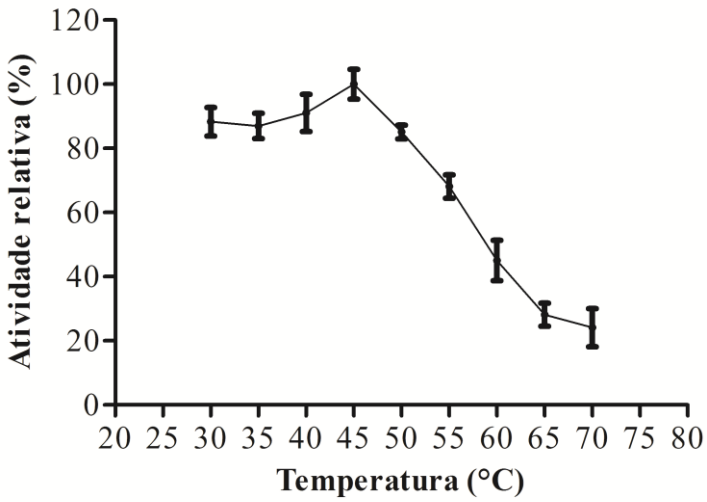

Figura 19. Influência da variação de temperaturas sobre a atividade proteolítica da peptidase isolada do bioprocesso submerso do fungo *Myceliophthora thermophila*. A atividade proteolítica foi determinada em triplicata com substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp em pH 6,5.

Khan et al. (2011) produziram serino peptidases em bioprocesso submerso por cepas de *Bacillus* ssp com temperatura ótima de 50 °C. Cheng et al. (2010) também observaram serino peptidases produzidas por microrganismos sob bioprocesso submerso, com atividade na faixa de 30 a 60 °C, com destaque a 50 °C. De acordo com Zanphorlin et al. (2011), *Myceliophthora thermophila* produziu uma serino peptidase com temperatura ótima entre 40 e 45 °C, o ensaio também foi conduzido com substrato peptídico FRET, entretanto, as enzimas se diferem por outras propriedades bioquímicas, o que sugere que são peptidases diferentes. Segundo a literatura existem outras serino

peptidases produzidas por microrganismos que apresentam temperatura ótima na faixa de 40 a 50 °C.

A avaliação da estabilidade da enzima em diferentes temperaturas e tempos de exposição mostrou a capacidade da enzima em manter sua atividade enzimática. Após exposição até 50 ºC durante 60 minutos, a atividade residual foi 80 %. A enzima manteve cerca de 100 % de sua atividade a 55 ºC até 15 minutos. A atividade residual a 55 ºC durante 30 minutos e 60 ºC durante 5 minutos foi de 25 % (Figura 20).

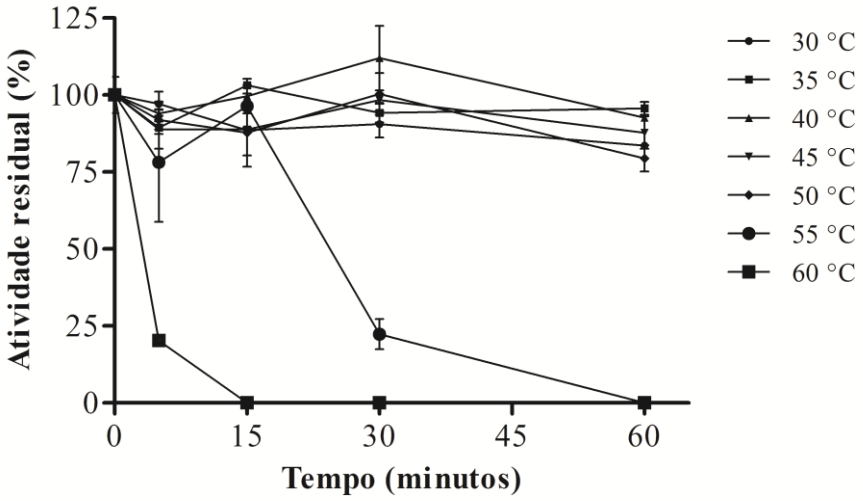

Figura 20. Estabilidade da peptidase isolada do bioprocesso submerso do fungo *Myceliophthora thermophila*, frente à exposição a diferentes temperatura e tempos. A atividade proteolítica foi determinada em triplicata com substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp a 45 °C, pH 6,5.

De acordo com Haddar et al. (2009), duas serino peptidases, produzidas por *Bacillus mojavensis* A21, mantiveram cerca de 55 % de suas atividades após 60 min de exposição a 50 °C. Liu et al. (2013) produziram serino peptidades utilizando *Planomicrobium* sp. L-2, as enzimas obtidas mantiveram cerca de 80 % de suas atividades a 50 °C e 60 °C após 20 min, a enzima não apresentou atividade proteolítica após 60 min de exposição a 50 ºC. Altas temperaturas podem promover modificações na estrutura das

proteínas, o que pode acarretar a perda de atividade proteolítica. A enzima isolada do *M. thermophila* apresentou melhor estabilidade que algumas descritas na literatura, o que aumenta as opções de aplicações quando considerado a termoestabilidade.

4.2.2.3. Efeito de íons na atividade proteolítica da enzima secretada pelo fungo *Myceliophthora thermophila*

Como já visto, os íons podem influenciar a atividade proteolítica, dependendo do íon e concentração pode haver um aumento na atividade proteolítica, trazendo benefícios na aplicação desta macromolécula. O ensaio do efeito de íons, sobre a atividade proteolítica, mostrou um aumento de 75 % após incubação com íon potássio e sofreu uma queda de 87 % na presença do íon cobre (Tabela 7).

Tabela 7. Influência de íons metálicos sobre a atividade proteolítica da peptidase isolada do bioprocesso submerso do fungo *Myceliophthora thermophila*. O ensaio foi realizado em triplicata na presença do substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp a 45 °C, em pH 6,5, a concentração final dos íons foi de 5 mM.

Íons metálicos	Atividade residual (%)
Controle	100,0 ± 6,4
Potássio	173,6 ± 4,6
Lítio	104,3 ± 10,1
Cálcio	89,6 ± 4,2
Magnésio	88,6 ± 4,0
Alumínio	85,2 ± 4,1
Bário	85,2 ± 8,5
Zinco	85,0 ± 6,0
Sódio	84,6 ± 10,5
Cobalto	77,1 ± 0,8
Níquel	77,2 ± 3,1
Manganês	75,0 ± 7,5
Cobre	12,7 ± 0,9

Os valores foram apresentados como média ± desvio padrão.

Segundo Graminho et al. (2013), uma serino peptidase produzida por *Penicillium waksmanii* também apresentou um aumento em sua atividade proteolítica após adição de potássio no meio de reação. De acordo com Devi et al. (2008), Cheng et al. (2010), Zanphorlin et al. (2011) e Liu et al. (2013) as serino peptidases produzidas por *Aspergillius niger*, *Bacillus alcalophillus* TCCC11004, *Myceliophtora* sp e *Planomicrobium* sp. L-2, respectivamente, foram inibidas na presença de cobre.

4.2.2.4. Efeito de inibidores na atividade proteolítica da enzima secretada pelo fungo *Myceliophthora thermophila*

O ensaio de efeito da adição de inibidores sobre a atividade proteolítica pode informar a classificação da peptidase de acordo com o principal resíduo de amino ácido presente no sítio catalítico da enzima. Neste estudo foi observado que a atividade enzimática foi inibida em cerca de 95 % na presença de PMSF. Este inibidor é clássico para as serino peptidases. A inibição pelo ácido iodo acético, agente de alquilação, ocorre devido a presença de resíduo de serina neste sítio ativo, quando a inibição por este inibidor é mais pronunciada, a enzima é classificada como cisteíno peptidase (Tabela 8).

Tabela 8. Influência de inibidores sobre a atividade proteolítica da peptidase isolada do extrato enzimático produzido pelo fungo *Myceliophthora thermophila* sob bioprocesso submerso. O ensaio foi realizado em triplicata na presença do substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp a 45°C, em pH 6,5, a concentração final dos inibidores foi de 5 mM.

Inibidores	Atividade residual (%)
Controle	100,0 ± 6,36
EDTA	95,30 ± 12,36
Àcido iodo acético	43,85 ± 0,48
PMSF	6,23 ± 2,83

Os valores foram apresentados como média ± desvio padrão.

4.2.2.5. Efeito de surfactantes na atividade proteolítica da enzima secretada pelo fungo *Myceliophthora thermophila*

O efeito dos surfactantes CTAB, SDS, Triton™ X-100 e Tween ® 20 sobre a atividade proteolítica da enzima secretada por *M. thermophila*, mostrou que apenas o SDS proporcionou um efeito pronunciado. A enzima manteve cerca de 85 % de atividade enzimática, na concentração de 0,04 % de SDS, e com o aumento da concentração ocorreu uma queda na atividade proteolítica, com atividade residual praticamente nula em 0,1 % de SDS. Os outros surfactantes, em todas concentrações testadas, proporcionaram um efeito positivo na atividade enzimática, na faixa de 10 a 30 % em relação ao controle (Figura 21).

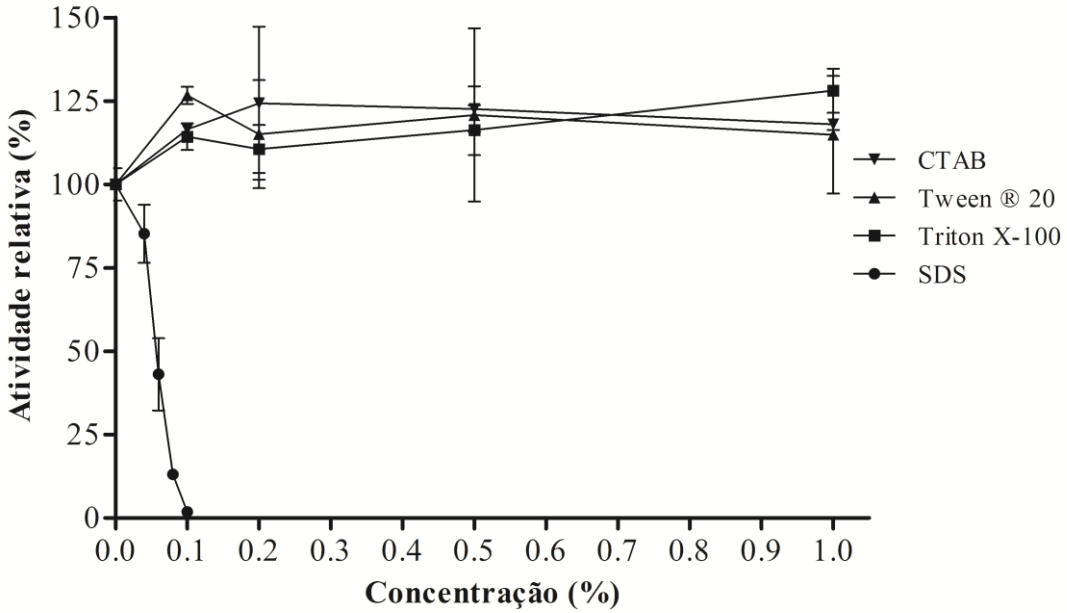

Figura 21. Influência dos surfactantes CTAB, SDS, Triton™ X-100 e Tween ® 20 sobre a atividade proteolítica da peptidase isolada do bioprocesso submerso do fungo *Myceliophthora thermophila*. O ensaio foi realizado em triplicata na presença do substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp a 45 °C, em pH 6,5.

Outros autores, Graminho et al. (2013), Wang et al. (2008), Papagianni e Sergelidin (2014) e Zanphorlin et al. (2011) também observaram modulação negativa pelo SDS em peptidases produzidas por *Penicillium waksmanii*, *Chryseobacterium*

taeanense, *Penicillium nalgiovense*, *Myceliophtora sp*, respectivamente. Algumas peptidases demonstraram estabilidade na presença deste surfactante, de acordo com Haddar et al. (2009), a enzima BM2 produzida por *Bacillus monjavensis* A21, apresentou uma redução de 17,2 % na atividade proteolítica na presença de 1 % de SDS. Adicionalmente, Tunga, Shrivastava e Banerjee (2008) observaram que a enzima produzida por *Aspergillus parasiticus* é estável a este surfactante.

Graminho et al. (2013) observaram um aumento de 70 % da atividade da serino peptidase na presença de triton, Wang et al. (2008) mostraram um aumento de 10 % na atividade proteolítica da enzima produzida por *Chryseobacterium taeanense* TKU001. Por outro lado, Merheb-Dini et al. (2009) e Zanphorlin et al. (2011) observaram que as enzimas produzidas por *Thermoascus aurantiancus* e *Myceliophtora* sp, respectivamente, são instáveis na presença de triton.

Segundo Zanphorlin et al. (2011), a enzima produzida por *Myceliophtora* sp por bioprocesso em estado sólido também sofreu um aumento em sua atividade na presença de tween.

4.2.2.6. Efeito de uréia, guanidina e ditiotreitol (DTT) na atividade proteolítica da enzima secretada pelo fungo *Myceliophthora thermophila*

Alguns reagentes que possuem poder redutor pode alterar a atividade de peptidases, este efeito ocorre em baixas concentrações (0,5 a 1 mM) e promove o aumento da atividade proteolítica devido a redução do enxofre do resíduo de cisteína presente no sítio catalítico (cisteino peptidases). No caso de enzimas pertencentes a outras classes de peptidases, como as secretadas pelo fungo *M. thermophila*, ocorre uma diminuição na atividade proteolíca. O efeito de DTT sobre a atividade da peptidase revelou que a partir

da concentração de 25 mM inicia-se a queda da atividade proteolítica, sendo que em 200 mM, a atividade enzimática reduz 75 %. Na presença da substância guanidina não foi observado nenhuma alteração na atividade enzimática e na presença de 50 mM de ureia foi observado um aumento cerca de 35 % (Figura 22).

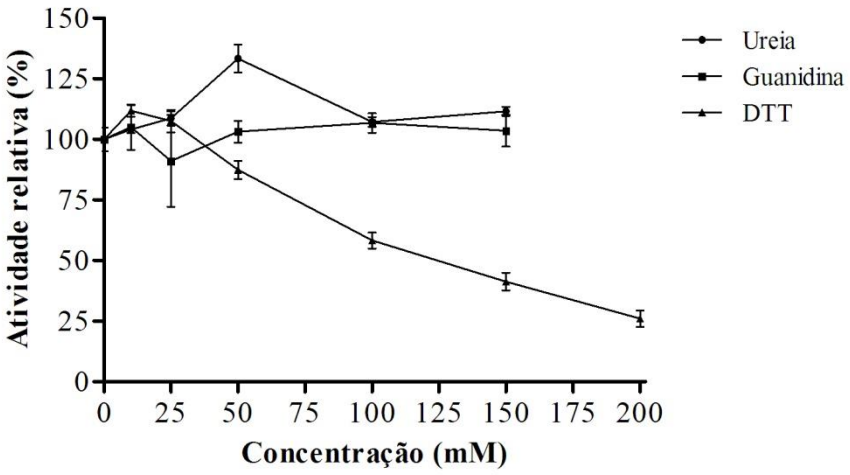

Figura 22. Influência das substâncias DDT, guanidina e ureia, sobre a atividade proteolítica da peptidase isolada do bioprocesso submerso do fungo *Myceliophthora thermophila*. O ensaio foi realizado em triplicata na presença do substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp a 45 °C, em pH 6,5.

No estudo de Merheb-Dini et al. (2009), a peptidase produzida pelo fungo *Thermoascus aurantiancus*, na presença de 300 mM de DTT, apresentou uma queda de atividade de 50 %. Sampaio e Silva (2011) produziram uma enzima, utilizando o fungo *Aspergillus clavatus*, a qual foi ativada na presença de DTT.

4.2.3. Estudos de cinética da enzima secretada pelo fungo *M, thermophila* utilizando substrato peptídico sintético com supressão intramolecular de fluorescência

A Tabela 9 mostra os parâmetros cinéticos da enzima isolada do bioprocesso submerso do fungo *Myceliophthora thermophila* em relação à substituição dos aminoácidos na posição P_1, P_2 e P_3 no substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp. Analisando os dados, podemos observar que na posição P_1 ocorre a hidrólise na presença de todos os aminoácidos, sendo que, glutamina e treonina nesta posição proporcionaram os maiores valores de eficiência catalítica da enzima, 411,8 e 503,2 $mM^{-1}.seg^{-1}$, respectivamente. Estes aminoácidos apresentam como semelhança o caráter polar e cadeias laterais alifáticas, o que mostra uma maior aceitação para resíduos de aminoácidos com estas características nesta posição. A enzima apresentou maior afinidade para substratos com glutamina nesta posição, apresentando K_M de 0,0051 mM. A substituição de alguns aminoácidos, na posição P_1, permitiu a clivagem de todos os substratos pela peptidase, porém com maior eficiência na presença de aminoácidos polares.

O subsítio S_2 da peptidase, do bioprocesso submerso do fungo *Myceliophthora thermophila*, não aceitou os aminoácidos glicina, asparagina e arginina na posição P_2 e possui uma maior eficiência na presença dos aminoácidos, metionina e valina, ambos de caráter apolar e cadeia lateral alifática, com eficiência catalítica de 424,2 e 1000,0 $s^{-1}.mM^{-1}$, respectivamente. A enzima apresentou maior afinidade com serina nesta posição, K_M 0,0025 mM. Os substratos que propiciaram maior eficiência catalítica, em sua maioria, apresentam resíduos de aminoácidos apolares, na posição P_2. A substituição de alguns aminoácidos, na posição P_2, não permitiu a clivagem do substrato pela peptidase, mostrando assim que a enzima apresenta certa especificidade para o tipo de aminoácido e características na posição P_2 do substrato Abz-K**X**RSSKQ-EDDnp.

Em relação às substituições nos resíduos de aminoácidos correspondentes ao subsítio P_3 do substrato Abz-**X**LRSSKQ-EDDnp, glutamina e metionina propiciaram maiores valores de eficiência catalítica, ambos com 500,0 $s^{-1}.mM^{-1}$. A enzima mostrou

maior afinidade pelo substrato contendo fenilalanina, com K_M de 0,0292 mM. Todos os resíduos de aminoácidos na posição P_3 permitiram a clivagem do substrato, mostrando assim uma menor especificidade da enzima em relação ao tipo de aminoácido na posição P_3. As posições P_1, P_2 e P_3 não apresentaram similaridade quanto ao perfil de eficiência catalítica, cada posição teve sua particularidade.

Tabela 9. Determinação dos parâmetros cinéticos dos subsítios (S_1, S_2 e S_3), da peptidase isolado do bioprocesso do fungo *Myceliophthora thermophila*. O ensaio foi conduzido em duplicata com substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp e substituições nas posições (P_1, P_2 e P_3), a 45 ºC e pH 6,5.

Substrato série P_1	**k_{cat}(s)**	**K_M (mM)**	**k_{cat}/K_M(s^{-1}. mM^{-1})**
Abz-KL**R**SSKQ-EDDnp	3,0	0,0489	61,4 ± 7,0
Abz-KL**T**SSKQ-EDDnp	7,9	0,0157	503,2 ± 12,6
Abz-KL**Q**SSKQ-EDDnp	2,1	0,0051	411,8 ± 58,2
Abz-KL**K**SSKQ-EDDnp	2,8	0,0071	394,4 ± 23,8
Abz-KL**A**SSKQ-EDDnp	3,8	0,0102	372,6 ± 16,1
Abz-KL**H**SSKQ-EDDnp	4,5	0,0146	308,2 ± 44,1
Abz-KL**N**SSKQ-EDDnp	2,7	0,0087	310,3 ± 0,3
Abz-KL**Y**SSKQ-EDDnp	2,5	0,0100	250,0 ± 33,7
Abz-KL**S**SSKQ-EDDnp	3,1	0,0127	244,1 ± 9,8
Abz-KL**W**SSKQ-EDDnp	1,2	0,0063	190,5 ± 23,3
Abz-KL**V**SSKQ-EDDnp	1,2	0,0073	164,4 ± 16,7
Abz-KL**M**SSKQ-EDDnp	5,9	0,0435	135,6 ± 16,5
Abz-KL**L**SSKQ-EDDnp	1,8	0,0131	137,4 ± 2,7
Abz-KL**F**SSKQ-EDDnp	1,4	0,0113	123,9 ± 6,2
Abz-KL**C**SSKQ-EDDnp	1,6	0,0181	88,4 ± 16,3
Abz-KL**I**SSKQ-EDDnp	0,5	0,0065	76,9 ± 3,3

Abz-KL**E**SSKQ-EDDnp	0,2	0,0052	38,5 ± 0,6
Abz-KL**D**SSKQ-EDDnp	0,4	0,0122	32,8 ± 2,1
Abz-KL**P**SSKQ-EDDnp	0,1	0,0089	11,2 ± 2,4

Substrato série P_2	**k_{cat}(s)**	**K_M (mM)**	**k_{cat}/K_M(s^{-1}. mM^{-1})**
Abz-K**L**RSSKQ-EDDnp	3.0	0.0489	61.4 ± 7.0
Abz-K**V**RSSKQ-EDDnp	4.2	0.0042	1000.0 ± 62.3
Abz-K**M**RSSKQ-EDDnp	2.8	0.0066	424.2 ± 16.9
Abz-K**I**RSSKQ-EDDnp	1.2	0.0045	266.7 ± 29.1
Abz-K**F**RSSKQ-EDDnp	4.3	0.0172	250.0 ± 12.5
Abz-K**T**RSSKQ-EDDnp	2.4	0.0118	203.4 ± 37.3
Abz-K**Y**RSSKQ-EDDnp	0.7	0.0064	109.4 ± 12.8
Abz-K**Q**RSSKQ-EDDnp	2.8	0.0290	96.6 ± 5.9
Abz-K**S**RSSKQ-EDDnp	0.2	0.0025	80.0 ± 4.1
Abz-K**C**RSSKQ-EDDnp	2.0	0.0267	74.9 ± 0.5
Abz-K**E**RSSKQ-EDDnp	2.0	0.0324	61.7 ± 4.0
Abz-K**P**RSSKQ-EDDnp	0.6	0.0216	27.8 ± 3.9
Abz-K**H**RSSKQ-EDDnp	0.4	0.0161	24.8 ± 1.6
Abz-K**D**RSSKQ-EDDnp	0.4	0.0440	9.1 ± 0.8
Abz-K**G**RSSKQ-EDDnp		Não hidrolisa	
Abz-K**N**RSSKQ-EDDnp		Não hidrolisa	
Abz-K**R**RSSKQ-EDDnp		Não hidrolisa	

Substrato série P_3	**k_{cat}(s)**	**K_M (mM)**	**k_{cat}/K_M(s^{-1}. mM^{-1})**
Abz-KL**R**SSKQ-EDDnp	3,0	0,0489	61,4 ± 7,0
Abz-**M**LRSSKQ-EDDnp	1,8	0,0036	500,0 ± 23,6
Abz-**E**LRSSKQ-EDDnp	5,8	0,0116	500,0 ± 4,9

Abz-**Y**LRSSKQ-EDDnp	3,9	0,0084	464,3 ± 11,7
Abz-**H**LRSSKQ-EDDnp	6,1	0,0136	448,5 ± 19,9
Abz-**V**LRSSKQ-EDDnp	2,5	0,0057	438,6 ± 43,3
Abz-**A**LRSSKQ-EDDnp	5,0	0,0121	413,2 ± 40,5
Abz-**F**LRSSKQ-EDDnp	1,1	0,0029	379,3 ± 7,1
Abz-**R**LRSSKQ-EDDnp	3,8	0,0104	365,4 ± 4,4
Abz-**S**LRSSKQ-EDDnp	3,6	0,0115	313,0 ± 4,3
Abz-**L**LRSSKQ-EDDnp	3,7	0,0141	262,4 ± 1,9
Abz-**I**LRSSKQ-EDDnp	2,3	0,0087	264,4 ± 19,3
Abz-**D**LRSSKQ-EDDnp	3,0	0,0115	260,9 ± 8,4
Abz-**N**LRSSKQ-EDDnp	2,7	0,0119	226,9 ± 18,2
Abz-**Q**LRSSKQ-EDDnp	1,2	0,0052	230,8 ± 11,4
Abz-**W**LRSSKQ-EDDnp	0,7	0,0057	122,8 ± 4,3

A Tabela 10 mostra os valores dos parâmetros cinéticos da peptidase isolada do bioprocesso submerso do fungo *Myceliophtora thermophila* com substituição em P'_1, P'_2 e P'_3. Os aminoácidos apolares, triptofano, valina, glicina, isoleucina e alanina em P'_1, foram os que mais propiciaram a hidrólise do substrato, com valores de 185,2, 224,7, 253,2 e 411,8 $s^{-1}.mM^{-1}$, respectivamente. A enzima apresentou maior afinidade para o substrato contendo aminoácido fenilalanina nesta posição, com K_M de 0,0053 mM. O substrato com prolina em P'_1 não foi hidrolisado. Este subsítio apresentou certa especificidade para substratos contendo aminoácidos de caráter apolar.

Analisando o subsítio S'_2, a enzima apresentou maior eficiência catalítica e afinidade para o substrato contendo alanina na posição correspondente do substrato,

eficiência catalítica 18200,0 $s^{-1}.mM^{-1}$ e K_M 0,0005 mM, respectivamente. Esse subsítio mostrou especificidade pelo substrato contendo o resíduo de aminoácido alanina em P'_2.

Na posição P'_3, os substratos que propiciaram maior eficiência catalítica foram com glicina, alanina, aspartato, metionina e serina, com eficiência catalítica de 554,1, 559,1, 606,1, 645,2 e 734,9 $s^{-1}.mM^{-1}$, respectivamente. Quanto ao caráter físico-químico, os substratos que obtiveram maior clivagem alternaram entre polar e apolar. A enzima mostrou maior afinidade com metionina nesta posição, K_M de 0,0031 mM.

Tabela 10. Determinação dos parâmetros cinéticos dos subsítios (S'_1, S'_2 e S'_3), da peptidase isolada do bioprocesso do fungo *Myceliophthora thermophila*. O ensaio foi conduzido em duplicata com substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp e substituições nas posições (P'_1, P'_2 e P'_3), a 45 ºC e pH 6,5.

Substrato série P'_1	**k_{cat}(s)**	**K_M (mM)**	**k_{cat}/K_M(s^{-1}. mM^{-1})**
Abz-KLR**S**SKQ-EDDnp	3,0	0,0489	61,4 ± 7,0
Abz-KLR**A**SKQ-EDDnp	4,2	0,0102	411,8 ± 25,9
Abz-KLR**I**SKQ-EDDnp	2,0	0,0079	253,2 ± 22,5
Abz-KLR**G**SKQ-EDDnp	2,0	0,0089	224,7 ± 12,2
Abz-KLR**V**SKQ-EDDnp	0,5	0,0027	185,2 ± 17,2
Abz-KLR**W**SKQ-EDDnp	1,6	0,0107	149,5 ± 1,0
Abz-KLR**Q**SKQ-EDDnp	1,0	0,0069	144,9 ± 9,0
Abz-KLR**M**SKQ-EDDnp	2,7	0,0210	128,6 ± 8,9
Abz-KLR**Y**SKQ-EDDnp	1,3	0,0107	121,5 ± 7,8
Abz-KLR**E**SKQ-EDDnp	1,7	0,0163	104,3 ± 8,2
Abz-KLR**F**SKQ-EDDnp	0,3	0,0053	56,6 ± 10,1
Abz-KLR**H**SKQ-EDDnp	0,7	0,0131	53,4 ± 2,0
Abz-KLR**R**SKQ-EDDnp	0,6	0,0137	43,8 ± 1,8
Abz-KLR**D**SKQ-EDDnp	0,4	0,0213	18,8 ± 0,9

Abz-KLR**P**SKQ-EDDnp

Substrato série P'$_2$	**k_{cat}(s)**	**K_M (mM)**	**k_{cat}/K_M(s^{-1}. mM^{-1})**
Abz-KL**R**SSKQ-EDDnp	3,0	0,0489	61,4 ± 7,0
Abz-KLRS**A**KQ-EDDnp	9,1	0,0005	18200,0 ± 622,0
Abz-KLRS**L**KQ-EDDnp	6,7	0,0087	770,1 ± 182,0
Abz-KLRS**Y**KQ-EDDnp	4,7	0,0064	734,4 ± 9,4
Abz-KLRS**M**KQ-EDDnp	3,5	0,0074	473,0 ± 85,5
Abz-KLRS**K**KQ-EDDnp	4,9	0,0114	429,8 ± 76,9
Abz-KLRS**H**KQ-EDDnp	3,2	0,0075	426,7 ± 41,4
Abz-KLRS**F**KQ-EDDnp	1,0	0,0023	434,8 ± 0,4
Abz-KLRS**I**KQ-EDDnp	1,9	0,0051	372,6 ± 23,4
Abz-KLRS**V**KQ-EDDnp	2,2	0,0060	366,7 ± 17,2
Abz-KLRS**W**KQ-EDDnp	3,8	0,0106	358,5 ± 43,3
Abz-KLRS**E**KQ-EDDnp	3,4	0,0183	185,8 ± 34,9
Abz-KLRS**D**KQ-EDDnp	3,0	0,0176	170,5 ± 12,3
Abz-KLRS**N**KQ-EDDnp	0,8	0,0049	163,3 ± 7,4
Abz-KLRS**Q**KQ-EDDnp	4,7	0,0285	164,9 ± 8,2
Abz-KLRS**R**KQ-EDDnp	2,5	0,0230	108,7 ± 6,5
Abz-KLRS**G**KQ-EDDnp	0,7	0,0148	47,3 ± 6,8
Abz-KLRS**P**KQ-EDDnp	0,2	0,0074	27,0 ± 3,0

Substrato série P'$_3$	**k_{cat}(s)**	**K_M (mM)**	**k_{cat}/K_M(s^{-1}. mM^{-1})**
Abz-KL**R**SSKQ-EDDnp	3,0	0,0489	61,4 ± 7,0
Abz-KLRSS**S**Q-EDDnp	9,7	0,0132	734,9 ± 52,4
Abz-KLRSS**M**Q-EDDnp	2,0	0,0031	645,2 ± 65,5
Abz-KLRSS**D**Q-EDDnp	6,0	0,0099	606,1 ± 37,8

Abz-KLRSS**A**Q-EDDnp	5,2	0,0093	559,1 ± 24,1
Abz-KLRSS**G**Q-EDDnp	8,2	0,0148	554,1 ± 17,0
Abz-KLRSS**Q**Q-EDDnp	2,2	0,0043	511,6 ± 52,9
Abz-KLRSS**P**Q-EDDnp	6,3	0,0125	504,0 ± 83,1
Abz-KLRSS**F**Q-EDDnp	4,4	0,0095	463,2 ± 59,0
Abz-KLRSS**Y**Q-EDDnp	4,1	0,0089	460,7 ± 66,1
Abz-KLRSS**W**Q-EDDnp	3,0	0,0072	416,7 ± 36,2
Abz-KLRSS**H**Q-EDDnp	2,2	0,0055	400,0 ± 10,8
Abz-KLRSS**L**Q-EDDnp	1,5	0,0041	365,9 ± 10,0
Abz-KLRSS**I**Q-EDDnp	3,8	0,0103	368,9 ± 12,3
Abz-KLRSS**T**Q-EDDnp	4,3	0,0118	364,4 ± 6,9
Abz-KLRSS**E**Q-EDDnp	3,1	0,0089	348,3 ± 27,3
Abz-KLRSS**R**Q-EDDnp	4,4	0,0138	318,8 ± 45,1
Abz-KLRSS**V**Q-EDDnp	1,9	0,0060	316,7 ± 6,0

Os valores foram apresentados como média ± desvio padrão.

Analisando os resultados obtidos, o lado ‘linha’ influenciou mais a eficiência catalítica, todos os subsítios aceitaram alanina na posição correspondente do substrato, com destaque para o subsítio S'_2, no qual a eficiência catalítica e a afinidade da enzima pelo substrato foi a maior na presença deste aminoácido.

Graminho et al. (2013) também realizaram ensaios cinéticos com substrato peptídico sintético, de maneira geral, a preferência de sua peptidase foi por aminoácidos de mesma características de polaridade, nas posições P_1, P_2, P'_1 e P'_2, entretanto com a eficiência catalítica mais pronunciada em substituições na posição na posição “não linha”. Zanphorlin et al., 2011, obtiveram uma enzima com preferências de aminoácidos apolares

nas posições P_2 e P'_2, semelhante ao que observamos, entretanto, mudanças dos aminoácidos nas posições do lado “não linha” proporcionaram maior eficiência catalítica.

4.3. Determinação do grau de hidrólise dos substratos proteicos (albumina de ovo, caseína e soro de leite)

O ensaio de grau de hidrólise foi realizado para avaliar se as peptidases hidrolisaram os substratos, se o tipo enzima e o tempo influenciam na proteólise, além disso, analisar se existe uma relação entre a quantidade de peptídeos formados influencia a atividade antioxidante destes peptídeos.

Foram avaliados o grau de hidrólise dos substratos albumina de ovo, caseína e soro de leite em diferentes tempos. Os hidrolisados foram obtidos com as enzimas de origem microbiana dos fungos *Eupenicillium javanicum* e *Myceliophthora termophila*, e a enzima comercial tripsina, nos seguintes tempos de reação 3, 6, 9 e 12 horas, a 45 ºC e 200 rpm, os resultados foram calculados em porcentagem em relação ao número de ligações peptídicas totais em cada substrato (Figura 23).

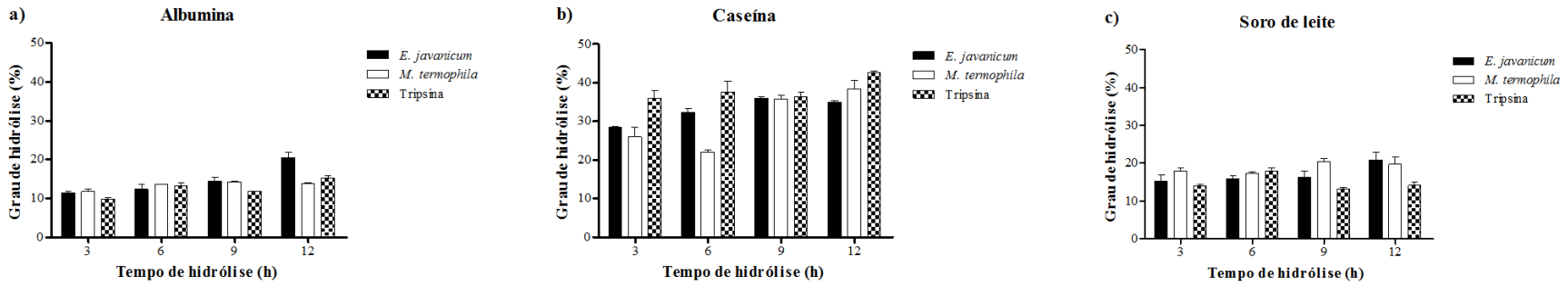

Figura 23. Grau de hidrólise dos substratos albumina (a), caseína (b) e soro de leite (c) após reação com as enzimas de origem microbianas (*E. javanicum* e *M. thermophila*) e comercial (tripsina). A reação foi conduzida em diferentes tempos (3, 6, 9 e 12 horas), a 45 ºC e 200 rpm.

Na análise da hidrólise do substrato albumina de ovo foi observado que com o aumento de seu tempo de incubação com a enzima do fungo *Eupenicillium javanicum* ocorreu um aumento no grau de hidrólise do substrato, ou seja, maior quantidade de quebra das ligações peptídicas em relação à quantidade total de ligações, após 12 horas de reação 20,54 % das ligações foram clivadas, porém não houve diferença significativa comparada com o tempo de 9 horas.

O mesmo substrato na presença da enzima do fungo *Myceliophthora thermophila* mostrou um aumento do grau de hidrólise com o passar do tempo de reação, com maior taxa de hidrólise após 9 horas de reação (14,36 %), entretanto, não houve diferença significativa entre os diferentes tempos testados.

Na presença da enzima tripsina nos diferentes tempos, foi observado que maiores tempos de incubação proporcionaram maior hidrólise da albumina, sendo que, 15,21 % das ligações peptídicas foram clivadas após 12 horas de reação, embora a taxa de hidrólise tenha sido maior no tempo de 6 horas em relação ao de 9 horas, esta diferença não foi significativa.

Em relação ao substrato caseína incubado com a enzima do fungo *E.javanicum*, o aumento do tempo de incubação propiciou maior taxa de clivagem da proteína, após 9 horas de incubação 36,04 % foram clivadas, porém não houve diferença significativa quando comparado com o tempo de 12 horas.

Em reação com a enzima do fungo *M.thermophila*, foi observado que com o aumento do tempo de reação houve um aumento do grau de hidrólise da caseína, sendo que 38,44 % das ligações peptídicas foram clivadas após 12 horas de ensaio, porém não houve diferença significativa entre os resultados nos diferentes tempos testados.

Em reação com a tripsina, a caseína apresentou grau de hidrólise de 42,60 % após 12 horas de incubação, esta porcentagem foi maior que nos outros tempos, entretanto, sem diferença significativa.

Na avaliação do grau de hidrólise do soro de leite em reação com a enzima do fungo *E.Javanicum* foi possível observar que com o aumento do tempo de reação, ocorreu um aumento na porcentagem de ligações peptídicas clivadas, sendo que após 12 horas, 20,85 % das ligações foram clivadas, e apresentou diferença estatística comparado com os outros tempos.

Em reação com a enzima do fungo *M. thermophila*, o maior grau de hidrólise foi após 9 horas de reação (20,26 %), sem diferença significativa entre os tempos testados.

Em reação com a tripsina apresentou maior grau de hidrólise após 6 horas, sendo que 17,83 % das ligações foram clivadas, sem diferença significativa.

A diferença de grau de hidrólise entre os diferentes tempos de reação, pode estar relacionado com a maior exposição do substrato à enzima, o que promove maior hidrólise.

A afinidade e especificidade da enzima pelo substrato também podem influenciar na diferença entre a porcentagem de hidrólise dos diversos substratos existentes em reação com as diferentes peptidases.

De maneira geral, o substrato caseína foi o mais clivado pelas diferentes enzimas, este resultado sugere uma maior afinidade das três enzimas em relação a este substrato em comparação à albumina e ao soro de leite.

4.4. Avaliação das atividades biológicas dos peptídeos produzidos por hidrólise enzimática

4.4.1. Atividade antioxidante

Os hidrolisados produzidos no ensaio de grau de hidrólise foram avaliados quanto as suas atividades antioxidantes. Para avaliar a atividade antioxidante dos peptídeos gerados, foram realizados ensaios, de capacidade em eliminação do radical ABTS, capacidade de sequestro do radical DPPH, capacidade em quelar ferro e poder redutor. Todos os hidrolisados testados não apresentaram capacidade de eliminar o radical ABTS e de poder redutor (dados não mostrados).

4.4.1.1. Atividade antioxidante: Ensaio de captura de radicais DPPH (2,2'-difenil-β-picrilhidrazil) e quelante de metal

A Tabela 11 mostra os resultados de sequestro do radical DPPH e de quelar metal dos hidrolisados de albumina de ovo, produzidos pela reação com a peptidase isolada do fungo *Eupenicillium javanicum*, nos diferentes tempos de hidrólise.

Tabela 11. Atividade de sequestro de radical livre DPPH e atividade de quelar ferro do hidrolisado do substrato albumina, em relação ao tempo de reação com a enzima isolada do bioprocesso submerso do fungo *Eupenicillium javanicum*.

Tempo de hidrólise (horas)	Atividade de sequestro de radical livre DPPH (%)	Atividade de quelar ferro (%)
3	16,06 ± 1,90	53,66 ± 4,32
6	12,34 ± 2,13	37,40 ± 0,45
9	14,90 ± 2,28	52,87 ± 2,53
12	20,08 ± 3,98	43,43 ± 0,33

Valores apresentados em média ± desvio padrão.

Os hidrolisados de albumina que apresentaram maior atividade de sequestro do radical livre DPPH foram aqueles que sofreram hidrólise por 12 horas (20,08 %), e

aqueles que apresentaram maior capacidade em quelar ferro foram aqueles que sofreram hidrólise durante 3 horas (53,66 %).

A Tabela 12 mostra os resultados de sequestro do radical DPPH e de quelar ferro dos hidrolisados de caseína, produzidos pela reação com a peptidase isolada do bioprocesso submerso do fungo *Eupenicillium javanicum*, nos diferentes tempos de hidrólise.

Tabela 12. Atividade de sequestro de radical livre DPPH e atividade de quelar ferro do hidrolisado do substrato caseína, em relação ao tempo de reação com a enzima isolada do bioprocesso submerso do fungo *Eupenicillium javanicum*.

Tempo de hidrólise (horas)	Atividade de sequestro de radical livre DPPH (%)	Atividade de quelar ferro (%)
3	29,26 ± 2,89	74,45 ± 5,82
6	38,68 ± 2,06	75,65 ± 3,18
9	48,87 ± 3,34	82,51 ± 2,50
12	24,26 ± 5,25	68,22 ± 3,45

Valores apresentados em média ± desvio padrão.

Os hidrolisados de caseína que apresentaram maior capacidade de sequestro do radical livre DPPH e de quelar ferro foram aqueles que reagiram durante 9 horas com a enzima do fungo *Eupenicillium javanicum*, com 48,87 e 82,51 %, respectivamente, além disso, de acordo com o ensaio de grau de hidrólise, após 9 horas foi quando se obteve maior quantidade de hidrolisados.

A Tabela 13 mostra os resultados de sequestro do radical DPPH e de quelar ferro dos hidrolisados de soro de leite, produzidos pela reação com a peptidase isolada do bioprocesso submerso do fungo *Eupenicillium javanicum*, nos diferentes tempos de hidrólise.

Tabela 13. Atividade de sequestro de radical livre DPPH e atividade de quelar ferro do hidrolisado do substrato soro de leite, em relação ao tempo de reação com a enzima isolada do bioprocesso submerso do fungo *Eupenicillium javanicum*.

Tempo de hidrólise (horas)	Atividade de sequestro de radical livre DPPH (%)	Atividade de quelar ferro (%)
3	16,33 ± 0,76	6,70 ± 2,47
6	16,98 ± 0,37	13,91 ± 7,58
9	16,69 ± 1,56	15,44 ± 6,40
12	14,30 ± 2,13	2,00 ± 3,79

Valores apresentados em média ± desvio padrão.

Não houve diferença significativa entre os resultados de capacidade em sequestrar o radical DPPH e de quelar ferro para os hidrolisados de soro de leite, clivados com a enzima do fungo *Eupenicillium javanicum*. As melhores atividades foram para o hidrolisado de 6 horas no ensaio de DPPH (16,98 %) e de 9 horas para o ensaio de quelar ferro (15,44 %).

A Tabela 14 mostra os resultados de sequestro do radical DPPH e de quelar ferro dos hidrolisados de albumina, produzidos pela reação com a peptidase isolada do bioprocesso submerso do fungo *Myceliophthora thermophila*, nos diferentes tempos de hidrólise.

Tabela 14. Atividade de sequestro de radical livre DPPH e atividade de quelar ferro do hidrolisado do substrato albumina, em relação ao tempo de reação com a enzima isolada do bioprocesso submerso do fungo *Myceliophthora thermophila*.

Tempo de hidrólise (horas)	Atividade de sequestro de radical livre DPPH (%)	Atividade de quelar ferro (%)
3	11,14 ± 2,02	67,13 ± 1,81
6	10,88 ± 4,42	63,66 ± 1,21
9	17,40 ± 1,71	67,33 ± 2,70
12	25,18 ± 0,38	54,88 ± 3,80

Valores apresentados em média ± desvio padrão.

O substrato albumina, após hidrólise durante 12 horas na presença da enzima isolada do bioprocesso submerso do fungo *Myceliophthora thermophila*, apresentou maior atividade em sequestrar o radical DPPH (25,18 %) e, após hidrolisado por 9 horas, maior atividade em quelar ferro (67,33 %).

A Tabela 15 mostra os resultados de sequestro do radical DPPH e de quelar ferro dos hidrolisados de caseína, produzidos pela reação com a peptidase isolada do bioprocesso submerso do fungo *Myceliophthora thermophila*, nos diferentes tempos de hidrólise.

Tabela 15. Atividade de sequestro de radical livre DPPH e atividade de quelar ferro do hidrolisado do substrato caseína, em relação ao tempo de reação com a enzima isolada do bioprocesso submerso do fungo *Myceliophthora thermophila*.

Tempo de hidrólise (horas)	Atividade de sequestro de radical livre DPPH (%)	Atividade de quelar ferro (%)
3	43,80 ± 1,91	93,68 ± 0,93
6	43,03 ± 3,68	94,65 ± 2,03
9	53,75 ± 2,03	96,09 ± 1,24
12	39,12 ± 5,18	97,74 ± 0,13

Valores apresentados em média ± desvio padrão.

Os hidrolisados de caseína com tempo de hidrólise de 9 horas sequestraram maior porcentagem de radicais livres DPPH (53,75 %) e hidrolisados de 12 horas de reação apresentaram maior capacidade em quelar ferro (97,74 %).

A Tabela 16 mostra os resultados de sequestro do radical DPPH e de quelar ferro dos hidrolisados de soro de leite, produzidos pela reação com a peptidase isolada do bioprocesso submerso do fungo *Myceliophthora thermophila*, nos diferentes tempos de hidrólise.

Tabela 16. Atividade de sequestro de radical livre DPPH e atividade de quelar ferro do hidrolisado do substrato caseína, em relação ao tempo de reação com a enzima isolada do bioprocesso submerso do fungo *Myceliophthora thermophila*.

Tempo de hidrólise (horas)	Atividade de sequestro de radical livre DPPH (%)	Atividade de quelar ferro (%)
3	15,02 ± 0,10	13,14 ± 4,26
6	12,93 ± 0,31	16,88 ± 6,06
9	14,90 ± 1,17	15,70 ± 7,13
12	16,21 ± 1,70	5,97 ± 11,13

Valores apresentados em média ± desvio padrão.

Semelhante ao que ocorreu com os hidrolisados de soro de leite produzidos pela enzima produzida pelo *Eupenicillium javanicum*, as secretadas pelo fungo *Myceliophthora thermophila* apresentaram menor capacidade de sequestro do radical DPPH e em quelar ferro, maior porcentagem foram 16,21 % (12 h de hidrólise) e 16,88 % (6 h de hidrólise).

A Tabela 17 mostra os resultados de sequestro do radical DPPH e de quelar ferro dos hidrolisados de albumina, produzidos pela reação com a peptidase comercial tripsina, nos diferentes tempos de hidrólise.

Tabela 17. Atividade de sequestro de radical livre DPPH e atividade de quelar ferro do hidrolisado do substrato albumina, considerando-se o tempo de hidrólise pela a enzima comercial tripsina (Sigma Aldrish®).

Tempo de hidrólise (horas)	Atividade de sequestro de radical livre DPPH (%)	Atividade de quelar ferro (%)
3	15,20 ± 0,37	55,92 ± 3,65
6	20,35 ± 4,17	65,10 ± 3,19
9	13,95 ± 437	65,36 ± 2,09
12	25,63 ± 1,77	51,69 ± 4,44

Valores apresentados em média ± desvio padrão.

O substrato albumina, após 12 horas de hidrólise com tripsina, produziu hidrolisados com capacidade em sequestrar radicais livres DPPH (25,63 %) e aqueles produzidos após 9 horas de reação foram os que apresentaram maior capacidade em quelar ferro (65,36 %).

A Tabela 18 mostra os resultados de sequestro do radical DPPH e de quelar ferro dos hidrolisados de caseína, produzidos pela reação com a peptidase comercial tripsina, nos diferentes tempos de hidrólise.

Tabela 18. Atividade de sequestro de radical livre DPPH e atividade de quelar ferro do hidrolisado do substrato caseína, considerando-se o tempo de hidrólise pela a enzima comercial tripsina (Sigma Aldrish®).

Tempo de hidrólise (horas)	Atividade de sequestro de radical livre DPPH (%)	Atividade de quelar ferro (%)
3	43,86 ± 2,75	93,91 ± 0,95
6	38,92 ± 2,71	94,93 ± 2,31
9	56,20 ± 1,25	97,12 ± 2,01
12	49,28 ± 0,37	97,21 ± 0,41

Valores apresentados em média ± desvio padrão.

A caseína, após ser hidrolisada por tripsina durante 9 horas, produziu hidrolisados capazes de sequestrar 56,20 % dos radicais livres DPPH, e aqueles hidrolisados por 12 horas foram capazes de quelar 97,21 % do ferro presente no meio reacional.

A Tabela 19 mostra os resultados de sequestro do radical DPPH e de quelar ferro dos hidrolisados de soro de leite, produzidos pela reação com a peptidase comercial tripsina, nos diferentes tempos de hidrólise.

Tabela 19. Atividade de sequestro de radical livre DPPH e atividade de quelar ferro do hidrolisado do substrato soro de leite, considerando-se o tempo de hidrólise pela a enzima comercial tripsina (Sigma Aldrish®).

Tempo de hidrólise (horas)	Atividade de sequestro de radical livre DPPH (%)	Atividade de quelar ferro (%)
3	14,84 ± 0,57	15,73 ± 8,72
6	12,84 ± 1,64	6,67 ± 0,47
9	12,16 ± 0,68	7,76 ± 0,52
12	11,92 ± 0,72	7,26 ± 12,34

Valores apresentados em média ± desvio padrão.

Semelhante ao que ocorreu com o soro de leite na presença das outras duas enzimas, quando hidrolisada com tripsina, produziu peptídeos com menor capacidade de sequestrar radicais DPPH (14,84 %) e de quelar ferro (15,73 %) quando comparado com os hidrolisados dos outros substratos.

De maneira geral, os hidrolisados produzidos por reações em maior tempo foram os que apresentaram maior capacidade de sequestrar radicais DPPH e quelar ferro, isso pode ser justificado por uma maior produção dos peptídeos de interesse. A caseína, quando hidrolisada pelas três enzimas, foi a qual apresentou melhores resultados em ambos os ensaios, o que pode estar diretamente relacionado à estrutura do substrato e a

capacidade destas enzimas em clivar esta proteína, desta maneira, produzindo uma maior quantidade dos peptídeos com atividades de interesse biológico.

Os principais processos antioxidativos, incluem a inativação de oxigênios reativos, sequestro de radicais livres, quelação de metais, redução da formação de peróxido de hidrogênio. A atividade antioxidante dos peptídeos está relacionada com a composição de aminoácidos, a sequência destes aminoácidos nos peptídeos, a massa molecular da cadeia destes peptídeos, os resíduos de aminoácidos N- e C-terminal, e as propriedades hidrofílicas (LI; YU, 2015).

De acordo com De Gobba et al. (2014), proteínas de soro de leite de cabra foram hidrolisadas com subtilisina ou tripsina, ou ambos e alguns hidrolisados apresentaram cerca de 80 % de capacidade em sequestrar radicais livres e em quelar ferro.

Segundo Vavrusova et al. (2015), hidrolisados de proteínas de soro de leite apresentaram atividade de eliminar radicais livres e em quelar ferro (95 %).

Proteínas de soro de leite de cabra e caseína foram hidrolisadas por pepsina, os peptídeos produzidos atuaram como doadores de elétrons que foram capazes de reduzir os radicais livres DPPH, convertendo em uma molécula estável (AHMED et al., 2015).

Os hidrolisados de soro de leite, produzidos pelas enzimas, alcalase, pancreatina e flavourzyme, apresentaram capacidade de quelar 96,5 % a 99,5 % do ferro presente no meio reacional (CAETANO-SILVA et al., 2015).

Caseinato de ovinos foram hidrolisados na presença de uma enzima microbial (*Bacillus* sp. P7), estes peptídeos apresentaram atividade em eliminar radicais livres ABTS (69,3-83,4 %) e DPPH (20,7 %- 30,9 %) e capacidade em quelar ferro (70,8-83,3 %), além disso poder redutor (CORRÊA et al., 2011).

4.4.2. Atividade inibitória de proliferação de células cancerígenas *in vitro*

4.4.2.1. Ensaio de viabilidade celular com células orais (Cal27, NOK, GN)

Ensaios de viabilidade celular foram conduzidos para avaliar o efeito dos hidrolisados em células orais tumorais (Cal27), além dos ensaios com as células de linhagem tumoral, foram realizados ensaios com células de linhagem normal (GN e NOK), com o intuito de verificar se os hidrolisados são citotóxicos apenas à células tumorais.

Analisando a Figura 24a, os hidrolisados provenientes de todos os substratos testados, tanto com a enzima comercial e do fungo *Eupenicillium javanicum*, inviabilizaram as células de linhagem tumoral Cal27. Os hidrolisados EC (enzima *Eupenicillium javanicum* + caseina) e TS (tripsina + soro de leite) inviabiliazaram cerca de 30 % das células tumorais após 24 horas. O efeito de EC se manteve, e o efeito de TS aumentou para 50 %, após 48 horas de exposição. Neste mesmo período o hidrolisado ES (enzima *Eupenicillium javanicum* + soro de leite) também apresentou efeito, aproximadamente de 30 % de inviabilidade das células. Após 72 horas de exposição, EA (enzima *Eupenicillium javanicum* + albumina) inviabilizou cerca de 40 % das células, o efeito de EC aumentou para cerca de 55 % e o do ES para cerca de 75 %, próximo ao valor do controle positivo que foi de aproximadamente 80 %, TA (tripsina + albumina) e TC (tripsina + caseina) também inviabilizaram as células com cerca de 50 % e TS inviabilizou 75 % das células.

A Figura 24b mostra os resultados de viabilidade celular da linhagem Cal27 em relação aos hidrolisados produzidos pela enzima proveniente do bioprocesso do fungo *Myceliophthora thermophila* comparado com tripsina e controle positivo. Assim como os hidrolisados produzidos pela enzima do outro fungo, o efeito mais pronunciado foi após

72 horas utilizando soro de leite, com cerca de 70 % de inviabilidade. Todos substratos hidrolisados com a enzima do fungo *Myceliophthora thermophila* demonstraram efeito após 72 horas, sendo o efeito cerca de 45 % (albumina de ovo) e cerca de 50 % (caseína). As células de câncer oral Cal27 após 72 horas de exposição ao tratamento com os hidrolisados produzidos com o substrato soro de leite na presença de ambas peptidases se destacaram quanto a inviabilidade celular, considerando este resultado, estas células tratadas com estes peptídeos foram selecionadas para o ensaio proteômico e ensaio *in vivo*.

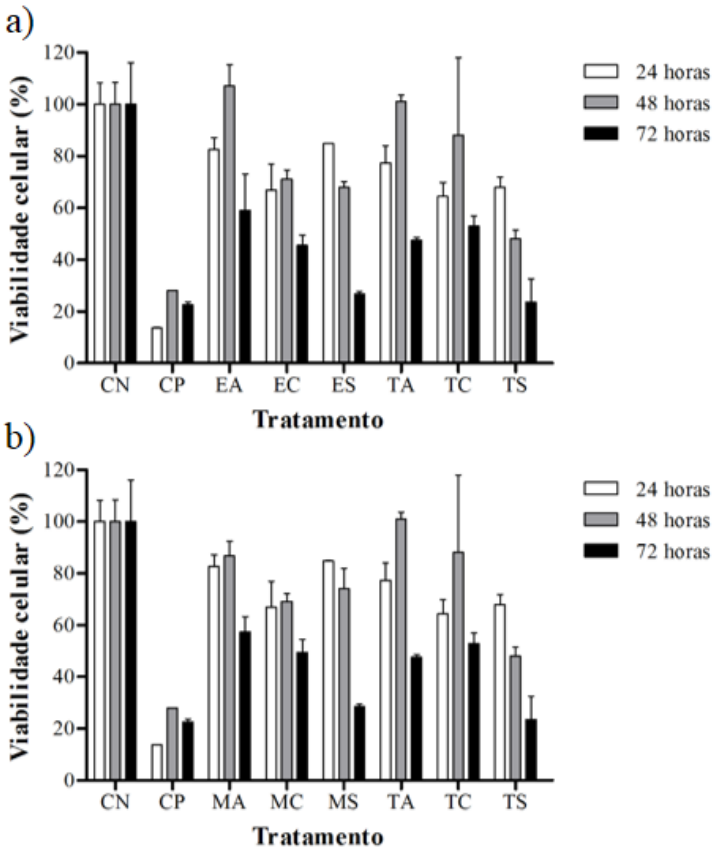

Figura 24. Viabilidade celular de linhagen tumoral Cal27 frente a hidrolisados proteicos de albumina de ovo, caseína e soro de leite (4,0 mg / mL). Hidrolisados obtidos utilizando a enzima comercial (tripsina Sigma Aldrish®) e enzimas produzidas por *Eupenicillium javanicum* (A) e *Myceliophthora thermophila* (B) sob bioprocesso submerso, a hidrólise ocorreu após 12 horas, 200 rpm e 45 ºC. Os resultados foram comparados entre o controle positivo (DMSO), controle negativo (água), e hidrolisados de tripsina e as enzima fúngica. O ensaio de viabilidade foi testada utilizando resazurina após 24, 48 e 72 horas.

A Figura 25 mostra a viabilidade da linhagem normal GN (a) e NOK (b) na presença dos substratos proteicos (albumina, caseína e soro de leite) e seus hidrolisados, produzidos pela ação das enzimas secretadas pelos fungo *E. javanicum* e *M. thermophila* comparados com controle positivo e negativo. Após 72 horas foi observado que o tratamento com estes hidrolisados aumentaram a proliferação celular da linhagem normal

GN, quando comparado com os controles. Este aumento foi cerca de 2 a 3 vezes em relação as células que não foram tratadas com os hidrolisados.

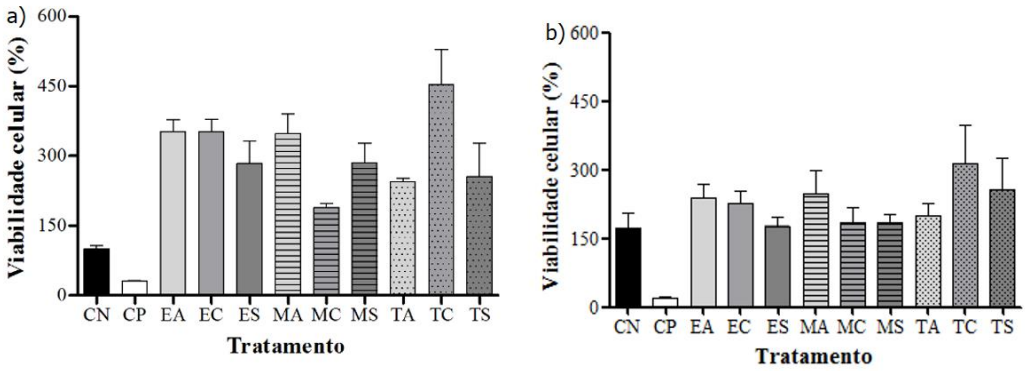

Figura 25. Viabilidade celular de linhagen tumoral GN (a) e NOK (b) frente a hidrolisados proteicos de albumina de ovo, caseína e soro de leite (4,0 mg / mL). Hidrolisados obtidos utilizando a enzima comercial (tripsina Sigma Aldrish®) e enzimas produzidas por *Eupenicillium javanicum* e *Myceliophthora thermophila* sob bioprocesso submerso, a hidrólise ocorreu após 12 horas, 200 rpm e 45 ºC. Os resultados foram comparados entre o controle positivo (DMSO), controle negativo (água), e hidrolisados de tripsina e as enzima fúngica. O ensaio de viabilidade foi testada utilizando resazurina após 24, 48 e 72 horas.

4.4.2.2.Ensaio de viabilidade celular com células de melanoma (B16F10)

Ensaios de viabilidade celular também foram conduzidos para avaliar o efeito dos hidrolisados em células de melanoma (B16F10).

Analisando a Figura 26a, os hidrolisados provenientes de todos os substratos testados, tanto com a enzima comercial e do fungo *Eupenicillium javanicum*, inviabilizaram as células de linhagem tumoral B16F10. Os hidrolisados ES (enzima *Eupenicillium javanicum* + soro de leite) e TS (tripsina + soro de leite) inviabiliazaram cerca de 60 % e 75 % das células tumorais após 72 horas. Na exposição ao DMSO (controle positivo) durante 72 horas, 85 % das células tumorais foram inviabilizadas.

A Figura 26b mostra o efeito dos hidrolisados produzidos por ação da enzima secretada pelo fungo *M. thermophila* sobre a viabilidade celular da linhagem B16F10,

comparando com a ação de hidrolisados com a tripsina, DMSO e água. O efeito mais pronunciado foi após 72 horas, de hidrolisados do substrato caseína (MC, enzima secretada por *M. thermophila* + caseína), e apresentou cerca de 75 % de inviabilidade. Hidrolisados de gelatina produzidos pela enzima do fungo *Myceliophthora thermophila* (MG) também foram testados, e apresentaram cerca de 75 % de inviabilidade celular após 72 horas de exposição (Figura 26c). De acordo com os resultados obtidos os hidrolisados de soro de leite (*E. javanicum*) e de gelatina (*M. thermophila*) apresentaram os efeitos mais interessantes na viabilidade celular da célula de melanoma (B16F10) e foram utilizados como tratamentos em ensaios proteômicos destas células tumorais.

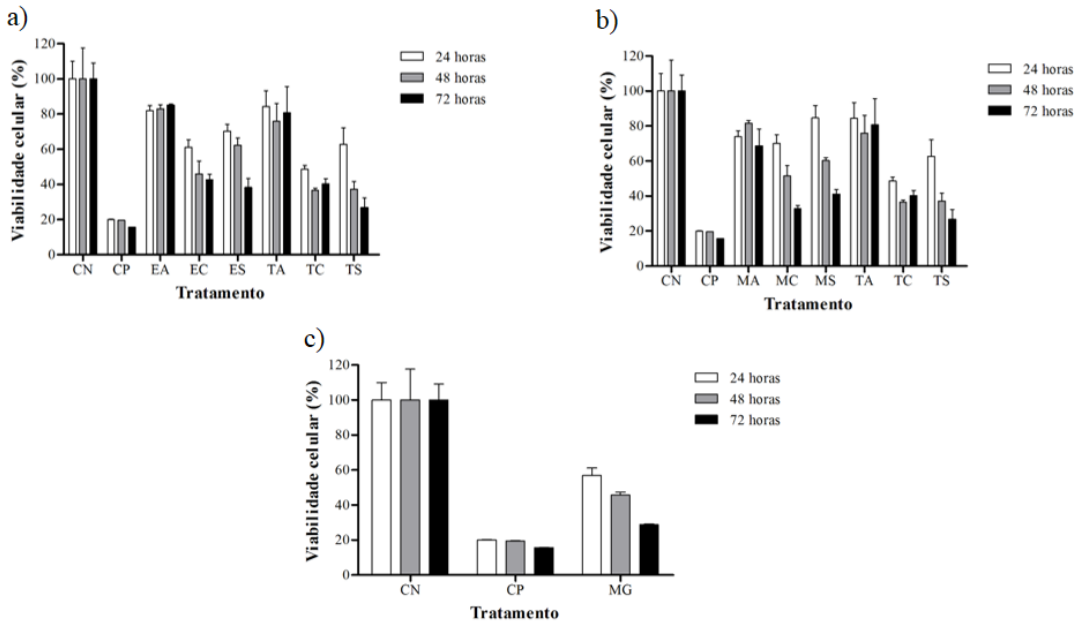

Figura 26. Viabilidade celular de linhagen tumoral B16F10 frente a hidrolisados proteicos de albumina de ovo, caseína e soro de leite (4,0 mg / mL). Hidrolisados obtidos utilizando a enzima comercial (tripsina Sigma Aldrish®) e enzimas produzidas por *Eupenicillium javanicum* (a) e *Myceliophthora thermophila* (b) sob bioprocesso submerso, a hidrólise ocorreu após 12 horas, 200 rpm e 45 ºC. Hidrolisados de gelatina gerados pela enzima de *M. thermophila* na mesmas condições também foram testados (c). Os resultados foram comparados entre o controle positivo (DMSO), controle negativo (água), e hidrolisados de tripsina e as enzima fúngica. O ensaio de viabilidade foi testada utilizando resazurina após 24, 48 e 72 horas.

4.4.3. Atividade inibitória de proliferação de células cancerígenas em camundongos

Ensaios de atividade antitumoral foram realizados em camundongos Balb/C nude com xenoenxertos de células de câncer oral Cal27, a concentração e o tipo de hidrolisados utilizados no tratamento foram baseados no ensaio *in vitro*. Hidrolisados de soro de leite obtidos por reação com as enzimas dos fungos *E. javanicum* e *M. thermophila* foram os dois tipos de tratamento selecionados, e o grupo controle foi tratado com soro fisiológico.

A Figura 27 representa a evolução do volume dos tumores após início dos tratamentos. As aplicações intratumorais de hidrolisados proteicos e soro fisiológico foram iniciadas após o pré estabelecimento dos tumores. Analisando a figura, podemos observar que o volume dos tumores tratados com hidrolisados mantiveram o volume do tumor próximo ao tamanho inicial, sem diferença estatística de acordo com ANOVA com pós teste de Tukey. A mesma análise estatística foi realizada em relação ao volume final e inicial do tumor tratado com soro fisiológico, de acordo com o teste, houve um aumento no tamanho durante o tratamento, com diferença estatística após 82 dias de tratamento, $p < 0,05$. Segundo o teste ANOVA com 2 fatores, seguido de pós teste de Bonferroni, houve diferença significativa entre o tamanho dos tumores tratados por hidrolisados proteicos e aquele tratado com soro fisiológico no final do tratamento, $p < 0,001$.

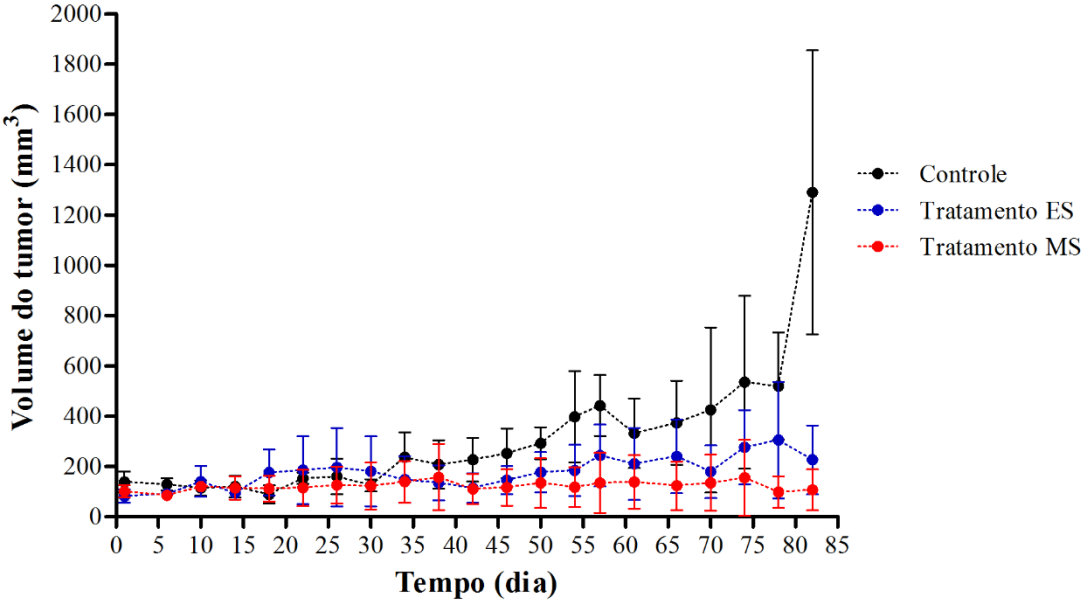

Figura 27. Evolução do volume de tumores de xenoenxerto de células Cal27 em camundongos Balb/c nude, durante o tratamento com peptídeos derivados de proteínas do soro de leite, produzidos por hidrólise com enzima microbiana secretada pelo fungo *E. javanicum* (ES) ou *M. thermophila* (MS). O tratamento foi com 10 µL de injeções intratumorais de solução 50 µg/µL de peptídeos a cada 72 horas durante 82 dias, o controle foi tratado nas mesmas condições apenas com solução salina.

Além da diferença estatística calculada entre as médias dos tumores de cada grupo do ensaio antitumoral de peptídeos derivados de proteínas de leite *in vivo* em camundongos xenoenxertados com células tumorais Cal27, também foi possível vizualizar a diferença entre o tamanho dos tumores, quando se compara grupo controle e tratamentos (Figura 28).

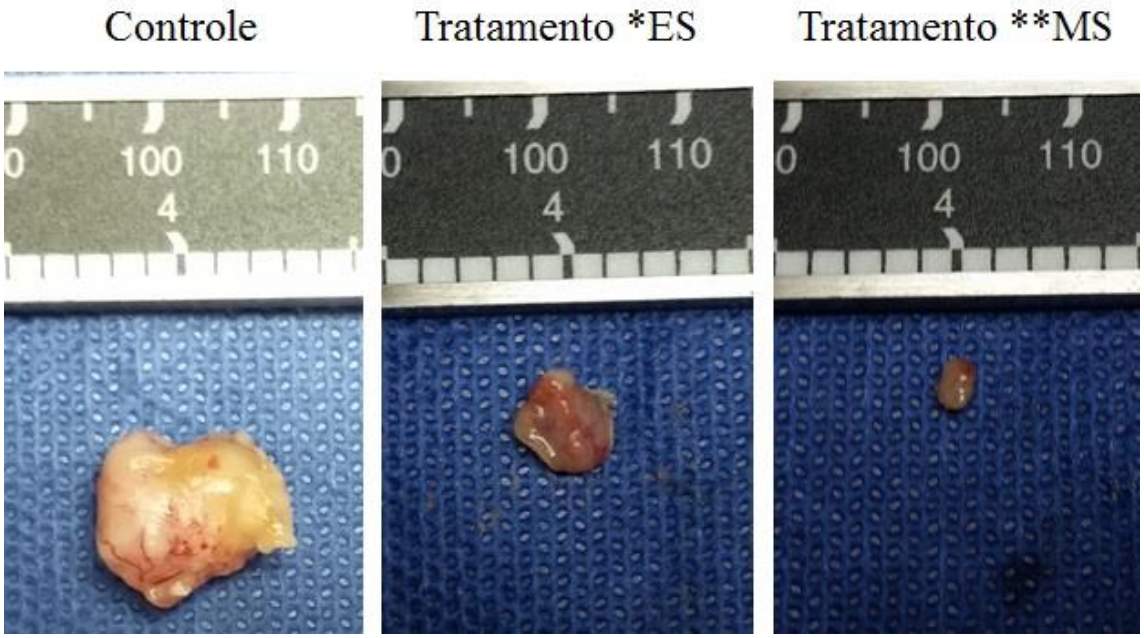

Figura 28. Representação de tumores de xenoenxerto de células Cal27 em camundongos Balb/c nude, após o tratamento com peptídeos derivados de proteínas do soro de leite, produzidos por hidrólise com enzima microbiana secretada pelo fungo *E. javanicum* (ES) ou *M. thermophila* (MS). O tratamento foi com 10 µL de injeções intratumorais de solução 50 µg/µL de peptídeos a cada 72 horas durante 82 dias, o controle foi tratado nas mesmas condições apenas com solução salina.

4.5. Estudos das diferentes proteínas expressas nos tratamentos de inibição de proliferação de células cancerígenas *in vitro*

4.5.1. Efeito do tratamento com peptídeos bioativos sobre a linhagem celular de carcinoma epidermóide Cal27

Após o estudo de viabilidade as células tumorais da linhagem Cal27 na presença de hidrolisados proteicos, estudos proteômicos destas células foram delineados para analisar a mudança na expressão de proteínas na presença dos tratamentos que causaram maior taxa de mortalidade celular. As células foram submetidas aos tratamentos com os hidrolisados de soro de leite com as enzimas dos fungos *E. javanicum* (ES) e *M. thermophila* (MS), e água (grupo controle), em seguida coletadas e lisadas, as proteínas

intracelulares foram extraídas para traçar o perfil proteômico como mostrado nos géis representativos obtidos após eletroforese bidimensional (Figura 29).

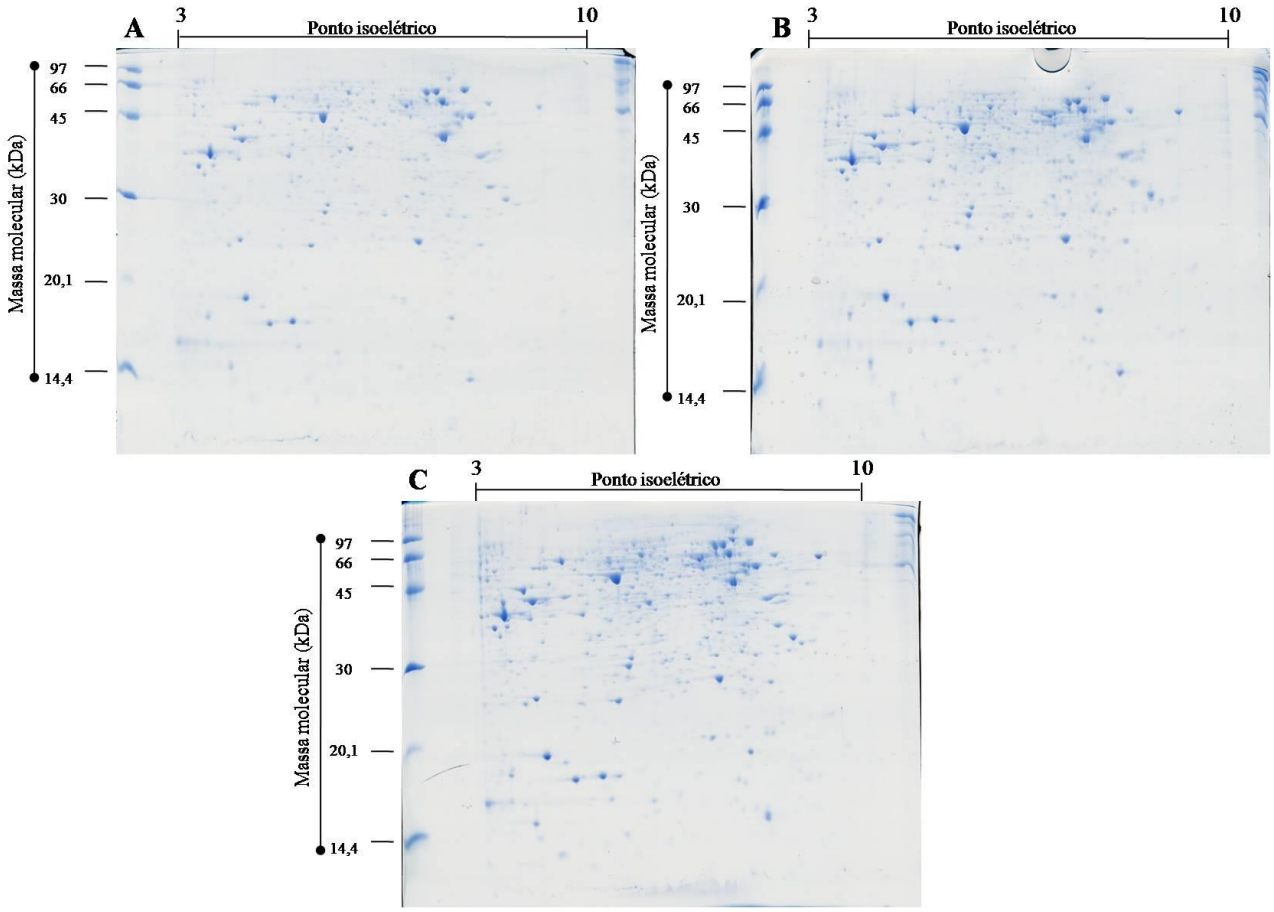

Figura 29. Representação do gel bidimensional de proteínas extraídas de células Cal27 após o tratamento *in vitro* com peptídeos bioativos. (A) Controle (água), (B) Tratamento ES (4 mg/mL), (C) Tratamento MS (4 mg/mL). O marcador de massa molecular utilizado foi o LMW-SDS Marker Kit com o seguinte padrão de bandas 97, 66, 45, 30, 20,1 e 14,4 kDa. Os géis com gradiente de pH linear imobilizado (13 cm, pH 3-10) foram carregados com 150 µg de proteínas totais e corados com solução de *Coomassie* coloidal G-250.

A análise do perfil de proteínas intracelulares demonstram que a maior parte das proteínas estão distribuídas na faixa de 30 a 97 kDa e distribuídas por uma ampla faixa de pH, sendo menos presentes na região mais alcalina do gel (pH > 9,0). Nos perfis de proteínas intracelulares dos grupos Controle, Tratamento ES e Tratamento MS foram detectados 546±12, 1005±128 e 1018±80 *spots*, respectivamente.

Após uma análise global, foram selecionados 71 *spots* que foram adequadamente processados e submetidos à espectrometria de massas. Após a seleção dos *spots* foram identificadas 27 sequências de proteínas, sendo que 16 sequências apresentavam diferenças quantitativas (*spots* comuns a pelo menos duas condições) e 9 sequências apresentavam diferenças qualitativas (*spots* exclusivos de uma condição). A Tabela 20 apresenta as 27 espécies de proteínas e as características relacionadas às mesmas.

Tabela 20. Lista de proteínas intracelulares de células da linhagem celular Cal27 após o tratamento com 4 mg/mL de peptídeos bioativos (ES e MS) e água.

Match ID	Proteína [Espécie]	Acesso	Escore	Cobertura	Massa (kDa)		pI		N.A.	*C	**ES	***MS	Anova
					Teór.	Obs.	Teór.	Obs.					
236	*Gamma-actin, partial [Homo sapiens]*	AAA51580.1	134	11	26	40	5,65	5,37	2,7	1,98	0,84	0,72	0,013458
88	*Prohibitin*	PHB_HUMAN	117	8	30	30	5,57	5,69	1,7	0,22	0,15	0,13	4,04E-04
171	*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*	G3P_HUMAN	66	4	36	37	8,57	8,86	1,7	0,36	0,21	0,25	3,78E-04
241	*Actin, cytoplasmic 1*	ACTB_HUMAN	149	6	42	40	5,29	5,31	3,4	1,92	0,79	0,57	0,019903
331	*Calreticulin*	CALR_HUMAN	64	2	48	49	4,29	3,77	107,1	0,39	0,00	0,01	5,92E-06
352	*Protein disulfide-isomerase*	PDIA1_HUMAN	88	3	57	52	4,76	4,61	5,0	0,47	0,11	0,09	9,25E-04
365	*60 kDa heat shock protein, mitochondrial*	CH60_HUMAN	268	7	61	52	5,7	5,36	1,7	2,22	1,28	1,33	5,49E-04
401	*Stress-70 protein, mitochondrial*	GRP75_HUMAN	392	9	74	59	5,87	5,63	3,1	1,76	0,61	0,57	1,53E-06
404	*Heat shock cognate 71 kDa protein*	HSP7C_HUMAN	202	5	71	60	5,37	5,46	1,9	1,77	0,94	1,04	4,48E-05
416	*78 kDa glucose-regulated protein*	GRP78_HUMAN	382	10	72	61	5,07	5,01	2,5	1,46	0,59	0,93	0,045419
2	*Profilin-1*	PROF1_HUMAN	133	20	15	14	8,44	8,85	2,1	0,46		0,21	0,007011
186	*Annexin A1*	ANXA1_HUMAN	243	16	39	38	6,57	6,88	3,0	0,05		0,02	0,018325
235	*Fructose-bisphosphate aldolase C*	ALDOC_HUMAN	54	6	40	40	6,41	8,15	1,9	0,18	0,33	0,34	0,007626

260	*Phosphoglycerate kinase 1*	PGK1_HUMAN	95	4	45	42	8,3	8,79	1,4	0,78	1,06	1,08	0,002124
503	*Peroxiredoxin-5, mitochondrial*	PRDX5_HUMAN	143	12	22	18	8,93	7,23				0,24	2,31E-07
520	*Stathmin*	STMN1_HUMAN	72	8	17	20	5,76	5,68				0,28	1,04E-06
695	*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*	G3P_HUMAN	249	12	36	41	8,57	9,11				0,55	0,040811
790	*Calreticulin*	CALR_HUMAN	181	6	48	59	4,29	3,87				0,53	0,029458
795	*Pyruvate kinase PKM*	KPYM_HUMAN	287	8	58	59	7,96	8,13				0,92	1,14E-07
799	*Protein disulfide-isomerase*	PDIA1_HUMAN	115	5	57	61	4,76	4,59				0,29	0,079394
453	*Stathmin*	STMN1_HUMAN	58	8	17	18	5,76	5,91	1,5	0,19	0,29		2,50E-04
480	*Pyruvate kinase PKM*	KPYM_HUMAN	327	12	58	57	7,96	8,21	3,4	0,32	1,11		0,002098
920	*Macrophage migration inhibitory fator*	MIF_HUMAN	72	7	13	13	7,74	8,57			0,29		3,67E-08
957	*Elongation factor 1-gamma*	EF1G_HUMAN	52	2	50	26	6,25	8,17			0,12		5,14E-06
1125	*Protein disulfide-isomerase*	PDIA1_HUMAN	47	3	57	56	4,76	4,56			0,37		3,21E-06
1141	*Unnamed protein product*	BAG65428.1	303	8	64	66	5,39	5,63			0,38		7,76E-07
1171	*Profilin-1*	PROF1_HUMAN	77	12	15	15	8,44	8,95			0,22		0,080911

Teór.: teórico; Obs.: observado; N.A.: nível de abundância.
*Controle: tratamento de células Cal27 com água;
** ES: tratamento de células Cal27 com peptídeos gerados após a hidrólise de soro de leite por peptidase produzida pelo fungo *E. javanicum;*
***MS: tratamento de células Cal27 com peptídeos gerados após a hidrólise de soro de leite por peptidase produzida pelo fungo *M. thermophila.*

4.5.1.1.Proteínas com abundâncias reduzidas após o tratamento com peptídeos bioativos

4.5.1.1.1. Efeito do tratamento com peptídeos bioativos sobre proteínas do citoesqueleto

Os *spots* 236 e 241 codificam sequências de γ-actina e β-actina, respectivamente. Actinas são proteínas eucarióticas altamente conservadas e que estão relacionadas a uma série de funções celulares (BUNNELL et al., 2011). Nesse estudo, os tratamentos ES e MS reduziram cerca de 3 vezes a abundância de γ-actina e β-actina. Simiczyjew et al. (2014) relataram que um maior nível de β- e γ-actinas levam ao remodelamento do citoesqueleto e a um aumento na capacidade de migração e invasão de células BE de adenocarcinoma de colon humano.

4.5.1.1.2. Efeito do tratamento com peptídeos bioativos sobre proteínas de choque térmico (*heat shock proteins* - HSP)

Os *spots* 365, 401 e 404 codificam sequências de diferentes tipos de proteínas de choque térmico. Os tratamentos ES e MS reduziram cerca de 1,7 a 3,1 vezes a abundância de diferentes tipos destas proteínas.

As proteínas de choque térmico são codificadas por diferentes genes e classificadas de acordo com sua massa molecular, além disso, devido as suas funções primárias como chaperonas, estas proteínas estão envolvidas em mecanismo de resistência ao estresse e à sobrevivência celular (CALDERWOOD et al., 2006).

Alguns estudos têm indicado que as proteínas de choque térmico estão altamente expressas em diferentes tipos de câncer e estão associadas à capacidade de sobrevivência da célula tumoral (LIANOS et al., 2015).

Neste contexto, as proteínas de choque térmica da família de HSP70 se destacam por estarem diretamente relacionadas à inibição da morte celular programada (apoptose) (CALDERWOOD et al., 2006) e à sobrevivência do tumor (JEGO et al., 2013). Lui e Kong (2006) mostraram que HSP70 inibe a flavoproteína que atua como fator indutor de apoptose (FIA). Gurbuxani et al. (2003) realizaram mutações em porções de HSP70 responsável pela interação com FIA e mostraram que a inibição de HSP70 reduz a tumorigenicidade.

A proteína reguladora de glicose 78 kDa (GRP78/Bip) indicada pelo *spot* 416 também pertence à classe de proteínas de choque térmico e foi mais abundante no proteoma de células controle.

Essa proteína é expressa constitutivamente e atua no controle de qualidade e degradação de proteínas. Entretanto, a GRP78/Bip é encontrada superexpressa em células tumorais e está envolvida em diferentes processos, tais como: controle da sinalização celular, proliferação, invasão e apoptose. Por esse motivo, a GRP78 tem sido um obstáculo ao tratamento de alguns tipos de câncer por conferir mecanismos de resistência (LEE, 2014). Lizardo et al. (2016) realizaram estudos *in vivo* com camundongos e apontam GRP78 como vital para o sucesso do processo metastático e redução da sobrevida desses animais.

4.5.1.1.3. Efeito do tratamento com peptídeos bioativos sobre as proteínas anexina A1, calreticulina, proibitina e profilina

Os *spots* 2 e 186 codificam proteínas que foram cerca de 2 e 3 vezes mais abundantes no controle em relação ao tratamento MS. A profilina foi codificada pelo *spot* 2 e é uma proteína que atua como ligante de monômeros de actina e está diretamente relacionada ao processo de motilidade celular. Lorente, Syriani e Morales (2014) indicaram que células tumorais apresentam um citoesqueleto mais dinâmico que células normais e que o aumento de profilina reduz a motilidade celular, reduzindo seu potencial de invasão. Neste estudo, as células com maior potencial proliferativo apresentaram um acúmulo de profilina, entretanto este aumento pode ser uma resposta à maior concentração de actinas também apresentadas por essas células.

Anexina A1 foi codificada pelo *spot* 186 e foi cerca de 3 vezes mais abundante no controle em relação ao tratamento MS. O *spot* correspondente à anexina A1 não foi detectado no tratamento ES. A anexina A1 é uma proteína ligada à fosfolipídeos e regulada por íons Ca^{+2} que está envolvida em diferentes processos celulares e pode se localizar no citoplasma, no núcleo e, também aderida ou interagindo com a membrana plasmática (BOUDHRAA et al., 2016).

A proteína calreticulina (*spots* 331 e 790) foi menos abundante no tratamento ES e é uma proteína multifunctional que pode atuar, por exemplo, como chaperona e como reguladora de íons Ca^{+2}. O acúmulo dessa proteína em células tumorais tem sido associado a uma maior proliferação celular, além de potencial de invasão e metástase (ZAMANIAN et al., 2013). Sheng et al. (2014) observaram em tecidos de pacientes que o acúmulo de calreticulina estava associado com a progressão do câncer pancreático.

O *spot* 88 codifica a sequência da proteína proibitina que foi cerca de 1,5 vezes mais abundante nas células do controle. A proibitina é uma proteína altamente conservada em eucariotos e possui uma série de funções biológicas e em células tumorais foram fundamentais para a proliferação e adesão celular (Sievers et al, 2010).

As controvérsias sobre o papel da proibitina em células tumorais podem ser reflexos das variadas funções assumidas por essa proteína em cada contexto celular. A abundância de proibitina pode variar de acordo com o tipo de câncer, no caso do câncer de próstata há uma redução de proibitina, por outro lado, em células de tumor gástrico, de ovário, de bexiga e de mama ocorre um acúmulo de proibitina (KOUSHYAR; JIANG; DART, 2015).

4.5.1.1.4. Efeito do tratamento com peptídeos bioativos sobre as proteínas gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e dissulfeto isomerase

A enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) é uma enzima amplamente conhecida por participar do metabolismo energético da célula (ITAKURA et al., 2015). Neste estudo, a GAPDH codificada pelo *spot* 171 encontrava-se cerca de 1,7 vezes menos abundantes nos cultivos submetidos ao tratamento com peptídeos bioativos. A abundância da enzima GAPDH tem sido encontrada aumentada em alguns tipos de câncer e, embora ainda não esteja esclarecida, é possível que uma maior taxa de glicólise pode estar associada a progressão da doença (GUO; SUN; LIU, 2013).

Por outro lado, o *spot* 695 indica a presença de GAPDH no tratamento MS, mas nesse caso esse aumento pode ser por outras funções não glicolíticas que também têm sido associadas a esta enzima, como por exemplo, reparo de DNA, regulação da transcrição e morte celular induzida por estresse oxidativo (ITAKURA et al., 2015). Esses resultados também são condizentes com a complexidade de funções da GAPDH que tem sido associada tanto a processos pró-apoptóticos quanto a processos tumorais (GANAPATHY-KANNIAPPAN; GESCHWIND, 2013)

A enzima dissulfeto isomerase tem papel vital no controle de qualidade de proteínas nas vias de secreção celular e atuam como oxidases, redutases, isomerases e chaperonas e, apresenta-se acumulada em alguns tipos de células tumorais (XU; SANKAR; NEAMATI, 2014).

Embora o *spot* 352 indique que os tratamentos com peptídeos bioativos tenham reduzido cerca de 5 vezes a concentração de dissulfeto isomerase, quando observamos os *spots* exclusivo 799 e 1125 podemos concluir que não houve diferença na abundância desta enzima. O ambiente tumoral favorece condições de estresse ao retículo endoplasmático com uma elevada concentração de proteínas com dobramento incorreto e, essa situação pode culminar na morte celular programada (VATOLIN, 2016). Sendo Cal27 uma célula tumoral, essa similaridade é justificável, uma vez que a produção dessa enzima é um mecanismo intrínseco dos processos celulares.

4.5.1.2. Proteínas com abundâncias aumentadas após o tratamento com peptídeos bioativos

4.5.1.2.1. Tratamento com peptídeos bioativos eleva concentração de enzimas do metabolismo energético

A alta taxa metabólica apresentada por células tumorais geram uma elevada concentração de espécies reativas de oxigênio (ERO), que alteram o equilíbrio da célula, podem danificar proteínas, lipídeos e DNA, e podem levar a uma série de respostas biológicas, tais como: necrose, senescência, apoptose ou ainda sobrevivência e proliferação (OZBEN, 2007).

O *spot* 503 exclusivo do tratamento MS codifica a proteína peroxiredoxina que possui ação antioxidante. Já no tratamento ES foram detectados o *spots* 1141 e 920 que codificam uma proteína com propriedade chaperona e o fator inibitório de migração de macrófago (MIF), respectivamente.

Alguns tipos de tratamento para tumores levam a um aumento da secreção da proteína MIF e esses tratamentos possuem como aspecto comum a geração de ERO (GUPTA et al, 2016). Israelson et al. (2015) indicaram que a proteína MIF pode atuar como chaperona e reduzir o acúmulo da enzima superóxido dismutase (SOD) com o *folding* incorreto. Por outro lado, a SOD é uma enzima com propriedades antioxidantes.

Entre as características que diferenciam células normais de células tumorais temos a forma de obtenção de energia. Enquanto células normais optam pela oxidação do piruvato na mitocôndria, células tumorais preferem a produção energética via glicólise, mesmo em condições aeróbias (KONIECZNA et al., 2015).

Após os tratamentos com peptídeos bioativos foi possível identificar como reflexos a presença de enzimas envolvidas na glicólise: GAPDH (*spots* 171 e 695); frutose bifosfato aldolase (ALDO) (*spot* 235); fosfoglicerato quinase 1 (PGK1) (*spot* 260) e piruvato quinase PKM (PKM) (*spots* 795 e 480).

A enzima GAPDH apresentou abundância similar entre controle e tratamentos. Por outro lado, ALDO, PGK1 e PKM tiveram suas abundâncias aumentadas nos tratamentos em relação ao controle cerca de 2, 2 e 3 vezes, respectivamente.

Os processos de glicólise e apoptose ao mesmo tempo em que são vitais para o metabolismo celular, são essencialmente divergentes. Danial et al. (2003) sugeriram que a fosforilação da proteína pró-apoptótica BAD mediada por glicose, aumenta a glicólise e previne a morte celular. A proteína pró-apoptótica BAD interage com a glucoquinase que atua na fosforilação da glicose em glicose-6-fosfato e, por esse motivo, pode ser um

ponto de interação entre glicólise e apoptose. Robinson et al. (2012) reforçaram o papel anti apoptótico da glicólise ao mostrar que a utilização da fosforilação oxidativa, como mecanismo de obtenção de energia, torna células de linfoma mais suscetíveis à morte celular.

A redução de actinas citoplasmáticas e de proteínas de choque térmico mediadas pelo tratamento com peptídeos bioativos indicam que estes podem ter reduzido a proliferação celular e ativado o mecanismo de morte celular programada das células Cal27. Embora o papel da proibitina ainda não esteja totalmente esclarecido, em conjunto com outros resultados, é possível que nesse estudo o acúmulo desta proteína seja um indicativo de maior potencial para proliferação celular. Outra vertente da ação dos peptídeos bioativos é a redução da disponibilidade, como consequência da menor taxa glicolítica (⇩ GAPDH).

As células tumorais são conhecidas por apresentar uma maior taxa metabólica e por ser menos suscetível à morte celular quando expostas a danos de diferentes origens (DOWNWARD, 2003). A redução na concentração de HSPs pelo tratamento com peptídeos bioativos pode ter refletido numa abundância similar de dissulfeto isomerase entre o controle e os tratamentos, porque por possuir função de chaperona a produção dessa enzima pode ter sido incrementada com o objetivo de reduzir os impactos da elevada concentração de proteínas com o dobramento incorreto.

Estes resultados também indicam que os tratamentos com peptídeos bioativos podem ter aumentado a concentração de ERO, o que levou, como mecanismo de defesa de Cal27, ao aumento na concentração de enzimas que visam minimizar os efeitos danosos de ERO que podem ocasionar a morte celular.

Além disso, a presença de peroxiredoxina (*spot* 593) no tratamento MS pode ter influenciado a abundância de GAPDH (*spot* 695) que estaria assumindo, nessa condição,

funções não glicolíticas como mecanismo de resistência ao estresse ocasionado pelo tratamento. Neste contexto, a morte celular promovida pelos tratamentos com peptídeos bioativos também pode ter aumentado a concentração de enzimas da glicólise nas células Cal27 como mecanismo de defesa para reduzir o processo de apoptose e também a redução na formação de ERO.

A Figura 30 esquematiza um dos possíveis mecanismo de ação dos peptídeos bioativos contra a proliferação das células da linhagem tumoral Cal27.

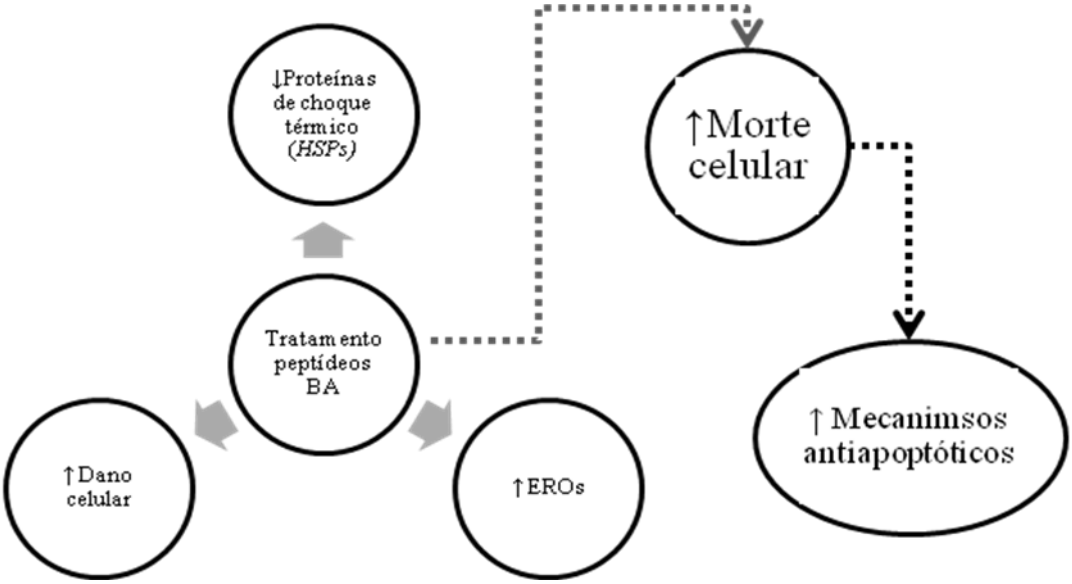

Figura 30. Sugestão de um dos possíveis mecanismo de ação dos peptídeos derivados de soro de leite contra as células de linhagem tumoral Cal27 após exposição por 72 horas ao tratamento.

4.5.2. Efeito do tratamento com peptídeos bioativos sobre linhagem celular de melanoma B16F10

Após a análise global comparativa das proteínas intracelulares das células B16F10 identificadas por LC-MS foram selecionadas: controle (água) x tratamento ES – 41 e 115

proteínas, respectivamente; controle (água) x tratamento MG – 102 e 42 proteínas, respectivamente.

4.5.2.1. Efeito do tratamento com peptídeos bioativos sobre as funções moleculares de células de melanoma B16F10

As proteínas identificadas foram submetidas ao Blast2GO para a classificação funcional e determinação da função molecular. Na Tabela 21 é possível ver as funções moleculares das sequências identificadas nos tratamentos ES e MG.

Tabela 21. Classificação da função molecular das sequências proteicas identificadas no proteoma de células de melanoma B16F10 após 48 horas de tratamento com soluções de peptídeos ou água (controle).

Função molecular	Tratamento *ES		Tratamento **MG	
	Controle (%)	Tratado (%)	Controle (%)	Tratado (%)
Ligação	64,5	100,0	69,0	78,6
Atividade catalítica	25,8	-	31,0	-
Constituinte estrutural de ribossomo	9,7	-	-	-
Atividade de molécula estrutural	-	-	-	21,4

*Tratamento ES: células B16F10 submetidas ao tratamento com solução de 4 mg/mL de peptídeos após a hidrólise de soro de leite por peptidase produzida pelo fungo *E. javanicum* em relação ao grupo controle tratado com água.
**Tratamento MG: células B16F10 submetidas ao tratamento com solução de 4 mg/mL de peptídeos gerados após a hidrólise de gelatina ultra pura por peptidase produzida pelo fungo *M. thermophila* em relação ao grupo controle tratado com água.

No tratamento ES, as proteínas do grupo controle possuem como principais funções: ligação, atividade catalítica e constituinte estrutural de ribossomo. Por outro lado, todas as sequências identificadas no grupo tratado possuem função de ligação. É

possível observar que o tratamento reduziu a diversidade de funções moleculares em relação ao grupo controle.

Já no tratamento MG, as proteínas do grupo controle atuam metabolicamente em funções de ligação e atividade catalítica. Por outro lado, as sequências identificadas no grupo tratado possuem função de ligação e atividade de molécula estrutural. Nesses grupos, é possível observar que o tratamento deu relevância para uma função molecular não apresentada pelo grupo controle.

Após a análise inicial, as funções moleculares foram avaliadas de modo mais específico. Com o objetivo de restringir os principais mecanismos no efeito de peptídeos bioativos sobre as células de melanoma, o filtro de *nodescore* foi ajustado para que apenas proteínas com escore > 3 fossem selecionadas.

Na Tabela 22 estão as funções moleculares do tratamento ES, cujas sequências obtiveram maiores escores.

Tabela 22. Categorização por escore da função molecular das sequências proteicas identificadas no proteoma de células de melanoma B16F10 do tratamento ES, após 48 horas.

Função molecular	**Controle**	**Tratamento *ES**
Ligação de nucleotídeo	-	6,00
Ligação de enzimas	3,60	3,96
Ligação de DNA	4,82	3,65
Ligação de RNAm 3'-UTR	-	3,00
Atividade de heterodinamização de proteína	3,00	-
Atividade de hidrolase	5,49	-
Constituinte estrutural de ribossomo	3,00	-
Ligação de ATP	5,00	-
Ligação de íon metálico	5,56	-
Ligação de poli(A) RNA	11,72	-
Ligação de proteína idêntica	3,60	-

Estas classificações foram estabelecidas após análises realizadas com auxílio do *software* Blast2GO Basic. Filtro para *nodescore* das sequências > 3.
*Tratamento ES: células B16F10 submetidas ao tratamento com solução de 4 mg/mL de peptídeos gerados após a hidrólise de soro de leite por peptidase produzida pelo fungo *E. javanicum* em relação ao grupo controle tratado com água.

No tratamento ES, tanto o grupo controle quanto o grupo tratado apresentaram uma maior quantidade de sequências envolvidas com a função de ligação (Tabela 22), entretanto quando observamos o tipo de ligação cujas sequências apresentaram maior escore, é possível notar as diferenças. Enquanto que as sequências com maior escore do grupo controle são exclusivas e estão envolvidas com a ligação ao poli (A) de RNA, no grupo tratado as sequências com maior escore estão envolvidas com a ligação de nucleotídeos, também de modo exclusivo. A função de ligação de DNA e de enzimas foi comum às duas condições e podem ser reflexos das necessidades básicas das células.

Na Tabela 23 estão as funções moleculares do tratamento MG, cujas sequências obtiveram maiores escores.

Tabela 23. Categorização por escore da função molecular das sequências proteicas identificadas no proteoma de células de melanoma B16F10 do tratamento MG após 48 horas.

Função molecular	Controle	Tratamento *MG
Ligação proteica	-	17,70
Ligação de poli(A) RNA	-	9,42
Ligação de nucleotídeo	10,46	5,26
Ligação DNA sequência específica	-	4,22
Atividade de molécula estrutural	-	4,20
Ligação de cadeia dupla de DNA	3,72	3,62
Ligação de enzimas	8,16	-
Atividade de hidrolase	3,35	-
Ligação de íon metálico	4,00	-
Ligação de RNAm	5,20	-
Atividade de homodimerização de proteína	3,00	-
Ligação de receptor	3,03	-
Atividade de transferase	7,32	-

Estas classificações foram estabelecidas após análises realizadas com auxílio do *software* Blast2GO Basic. Filtro para *nodescore* das sequências > 3.
*Tratamento MG: células B16F10 submetidas ao tratamento com solução de 4 mg/mL de peptídeos gerados após a hidrólise de gelatina ultra pura por peptidase produzida pelo fungo *M. thermophila* em relação ao grupo controle tratado com água.

No tratamento MG, tanto o grupo controle quanto o grupo tratado apresentaram uma maior quantidade de sequências envolvidas com a função de ligação (Tabela 23), entretanto quando observamos o tipo de ligação cujas sequências apresentaram maior escore, é possível notar as diferenças.

No grupo controle, as sequências com maior escore estão envolvidas com a ligação de nucleotídeos. Já o grupo tratado, as sequências com maior escore estão envolvidas com a ligação de proteínas, de modo exclusivo. As funções de ligação de DNA de cadeia dupla e de nucleotídeos foram comuns às duas condições, embora os escores fossem maiores no grupo controle.

4.5.2.2. Efeito do tratamento com peptídeos bioativos sobre os processos biológicos de células de melanoma B16F10

As proteínas identificadas foram submetidas ao Blast2GO para a classificação funcional e determinação do processo biológico. Na Tabela 24 é possível ver os processos biológicos nos quais as sequências identificadas nos grupos controle e tratado do tratamento ES estão envolvidas.

Tabela 24. Classificação dos processos biológicos nos quais as sequências proteicas identificadas no proteoma de células de melanoma B16F10, após 48 horas do tratamento ES, estão envolvidas.

Processo biológico	**Controle (%)**	**Tratamento *ES (%)**
Processo metabólico	13,9	19,6
Processo celular	14,6	17,6
Regulação de processos biológicos	8,8	17,6
Processo de organismo individual	13,1	13,7
Regulação positiva de processos biológicos	-	13,7
Resposta a estímulos	7,3	13,7
Processo de desenvolvimento	5,8	3,9
Biogênese e organização do componente celular	8,8	-
Desenvolvimento de sistema	1,5	-
Processo de organismo multi celular	5,8	-
Regulação biológica	6,6	-
Regulação negativa de expressão gênica	2,9	-
Regulação negativa de transcripção, DNA-modelo	2,2	-
Transcripção viral	2,2	-
Transporte	6,6	-

*Tratamento ES: células B16F10 submetidas ao tratamento com solução de 4 mg/mL de peptídeos gerados após a hidrólise de soro de leite por peptidase produzida pelo fungo *E. javanicum* em relação ao grupo controle tratado com água.

No tratamento ES, tanto as proteínas do grupo controle quanto as do grupo tratado atuam principalmente em processos metabólicos e celulares, entretanto as proteínas do grupo controle atuam numa maior diversidade de processos biológicos quando comparadas ao grupo tratado. No grupo tratado, os processos biológicos são mais restritos e, entre estes processos é possível destacar que o tratamento gerou uma maior

concentração de sequências envolvidas em processos de regulação. Além disso, de forma exclusiva, os peptídeos bioativos desencadearam, de forma direta ou indireta, mecanismos metabólicos de resposta a estímulos.

Na Tabela 25 é possível ver os processos biológicos nos quais as sequências identificadas nos grupos controle e tratamento MG estão envolvidas.

Tabela 25. Classificação dos processos biológicos nos quais as sequências proteicas identificadas no proteoma de células de melanoma B16F10, após 48 horas de tratamento MG, estão envolvidas.

Processo biológico	**Controle (%)**	**Tratamento *MG (%)**
Processo celular	12,7	19,3
Processo de organismo individual	9,5	15,8
Processo metabólico	12,7	14,0
Regulação de processos biológicos	8,2	14,0
Resposta a estímulos	7,0	10,5
Processo de organismo multicelular	-	10,5
Processo de desenvolvimento de organismo individual	-	10,5
Transporte intracelular de proteína	-	5,3
Regulação biológica	8,2	-
Biogênese de componente celular	5,1	-
Organização de componente celular	7,0	-
Processo de desenvolvimento	5,1	-
Processo de organismo multi celular	5,1	-
Processo multi organismo	3,8	-
Regulação negativa de processo biossintético metabólico de macromolécula celular	3,2	-
Regulação negativa de processo metabólico de macromolécula	4,4	-
Regulação negativa de transcrição de ácido nucléico-modelo	2,5	-
Regulação positiva de processos biológicos	5,7	-

*Tratamento MG: células B16F10 submetidas ao tratamento com solução de 4 mg/mL de peptídeos gerados após a hidrólise de gelatina ultra pura por peptidase produzida pelo fungo *M. thermophila* em relação ao grupo controle tratado com água.

No tratamento MG, os processos celulares possuíam correlação com a maior parte das sequências do grupo controle e do grupo tratado. Além disso, foi possível observar

que as sequências do grupo controle atuavam em processos biológicos mais diversificados. Por outro lado, uma maior porcentagem de sequências de proteínas estava envolvida na regulação de processos biológicos e na resposta a estímulos.

Após a análise inicial, os processos biológicos foram avaliados de modo mais específico. Com o objetivo de restringir os principais processos envolvidos no efeito de peptídeos bioativos sobre as células de melanoma, o filtro de *nodescore* foi ajustado para que apenas proteínas com escore > 3 fossem selecionadas.

Na Tabela 26 estão os processos biológicos do tratamento ES, cujas sequências obtiveram maiores escores.

Tabela 26. Categorização por escore dos processos biológicos das sequências proteicas identificadas no proteoma de células de melanoma B16F10 do tratamento ES após 48 horas.

Processo biológico	**Controle**	**Tratamento *ES**
Processo de apoptose	-	5,85
Splicing de RNAm, via spliceosomo	4,80	5,20
Resposta inflamatória	-	4,96
Resposta ao estresse oxidativo	-	4,56
Regulação de transcrição, DNA-modelo	-	3,94
Transcrição do promotor da RNA polimerase II	6,40	3,80
Tradução	5,76	3,32
Regulação positiva de processos biológicos	-	3,16
Resposta a composto contendo oxigênio	-	3,16
Desenvolvimento de órgão animal	-	3,05
Processo biossintético de ATP	3,72	-
Diferenciação celular	7,99	-
Silenciador de cromatina	4,20	-
Geração de Metabólitos precursores e energia	-	-
Desenvolvimento de organismo multicelular	8,25	-
Ossificação	4,20	-
Processo de oxido-redução	4,72	-
Morte celular programada	5,54	-
Complexo de montagem PROTEICo	3,41	-
Regulação de ciclo celular	3,29	-
Resposta ao estresse	4,24	-
Biogênese de subunidade pequena ribossomal	4,20	-
Processador de RNAr	3,00	-
Transporte transmembrana	5,37	-
Transcrição viral	3,36	-

Estas classificações foram estabelecidas após análises realizadas com auxílio do *software* Blast2GO Basic. Filtro para *nodescore* das sequências > 3.
*Tratamento ES: células B16F10 submetidas ao tratamento com solução de 4 mg/mL de peptídeos gerados após a hidrólise de soro de leite por peptidase produzida pelo fungo *E. javanicum* em relação ao grupo controle tratado com água.

No grupo sem tratamento, os destaques são os processos de desenvolvimento de organismo multicelular e diferenciação celular. Por outro lado, quando avaliamos quais processos foram exclusivos do tratamento ES com peptídeos bioativos, observamos que as sequências com maior escores estão envolvidas com processo de apoptose, resposta inflamatória e resposta ao estresse oxidativo.

A determinação da morte celular por apoptose ou necrose representa uma linha muito tênue (ZARE-MIRAKABADI et al., 2012) e a resposta inflamatória é uma

característica da ocorrência de necrose (IYER et al., 2009). Nesse contexto, é possível indicar que a morte celular, mediada pelos peptídeos bioativos, esteja ocorrendo via apoptose e/ou necrose, embora os resultados apresentados não sejam suficientes para esta comprovação.

Na Tabela 27 estão processos biológicos do tratamento MG, cujas sequências obtiveram maiores escores.

Tabela 27. Categorização por escore dos processos biológicos das sequências proteicas identificadas no proteoma de células de melanoma B16F10 do tratamento MG após 48 horas.

Processo biológico	**Controle**	**Tratamento (*MG)**
Regulação de transcrição, DNA-modelo	-	4.20
Transporte intracelular de proteína	-	3.82
Dobramento de proteína mediado por chaperona	-	3.60
Respiração aeróbica	4.20	-
Estimulo a resposta celular	4.04	-
Modificação de cromatina	3.35	-
Splicing de RNAm, via spliceosomo	8.16	-
Desenvolvimento de organismo multicelular	7.91	-
Regulação negativa de transcrição, DNA-modelo	5.56	-
Processo metabólico de ácido orgânico	3.26	-
Diferenciação de osteoblasto	3.00	-
Regulação positiva de transcrição do promotor da RNA polimerase II	4.00	-
Tetramerização de proteína	4.20	-
Regulação de ciclo celular	3.68	-
Resposta a ácido químico	3.12	-
Resposta a lipídeos	3.93	-
Resposta a composto contendo oxigênio	5.87	-

Estas classificações foram estabelecidas após análises realizadas com auxílio do *software* Blast2GO Basic. Filtro para *nodescore* das sequências > 3.
*Tratamento MG: células B16F10 submetidas ao tratamento com solução de 4 mg/mL de peptídeos gerados após a hidrólise de gelatina ultra pura por peptidase produzida pelo fungo *M. thermophila* em relação ao grupo controle tratado com água.

No tratamento MG, dentre uma série de processos biológicos, o grupo controle apresentou sequências com maiores escores envolvidas no *splicing* de RNAm e no desenvolvimento de organismo multicelular. Já no grupo tratado, as sequências de

maiores escores estavam envolvidas apenas em três processos biológicos: regulação de transcrição, transporte intracelular de proteínas e dobramento de proteínas por chaperonas. Além disso, não houve similaridade entre nenhum processo biológico entre os grupos controle e tratado.

Considerando os tratamentos ES e MG, podemos observar que as funções moleculares, assim como os processos biológicos mais relevantes de cada grupo não apresentam convergência metabólica. Os dois tratamentos proporcionaram, apesar das características específicas, alguns pontos em comum, que são: maior diversificação de funções moleculares no grupo controle e poucas funções moleculares comuns entre o tratado e o controle. Além disso, é notória a baixa e/ou inexistente similaridade entre os processos biológicos de cada grupo. Por esse motivo, estes resultados são condizentes com os dados de viabilidade celular de células de melanoma B16F10.

De maneira geral em ambos os tratamentos ocorreu diminuição na abundância de algumas proteínas relacionadas com a progressão tumoral, como as HSPs e moléculas com atividade de chaperona e proteínas ribossomais. Como já dito anteriormente, as HSPs e moléculas com atividade de chaperonas são expressas em grandes quantidades nos diferentes tipos de câncer e estão envolvidas na resistência ao estresse e morte celular, consequentemente, a diminuição destas proteínas inviabilizam as células tumorais.

O nucléolo é uma estrutura subnuclear das células, responsável pela síntese de ribossomos e subunidades ribossomais. O tamanho do nucléolo varia entre as células e reflete a taxa de biogênese de ribossomos, ou seja, quanto maior a produção de ribossomos maior o tamanho do nucléolo. Nucléolos grandes são encontrados em células que requerem síntese contínua de ribossomos, por outro lado, apresenta seu tamanho diminuído após parada do ciclo celular (TAKADA; KURISAKI, 2015).

Muitos estudos foram realizados em relação a células cancerígenas, e foram observados que em células tumorais progressivas, os nucléolos eram grandes e irregulares. Existe uma evidência que a biogênese do ribossomo é regulada por oncogenes e supressores tumorais e que alterações nestes aumentam a síntese de ribossomos devido uma maior demanda de proteínas para a proliferação rápida de células cancerígenas, o que resulta na hipertrofia dos nucléolos (TAKADA; KURISAKI, 2015).

4.6. Estudos das diferentes proteínas expressas nos tratamentos de inibição de proliferação de células cancerígenas Cal27 *in vivo*

Após a análise global comparativa das proteínas intracelulares das células Cal27 do tumor identificadas por LC-MS foram selecionadas: controle (água) x tratamento ES – 93 e 103 proteínas, respectivamente; controle (água) x tratamento MS – 70 e 120 proteínas, respectivamente.

4.6.1. Efeito do tratamento com peptídeos bioativos sobre as funções moleculares de células Cal27 *in vivo*

As proteínas identificadas foram submetidas ao Blast2GO para a classificação funcional e determinação da função molecular. Na Tabela 28 é possível ver as funções moleculares das sequências identificadas nos tratamentos ES e MS.

Tabela 28. Classificação da função molecular das sequências proteicas identificadas no proteoma do tumor de células Cal27 desenvolvido em camundongos Balb/C nude nos diferentes tratamentos com 500 µg de peptídeos bioativos a cada 48 horas durante 82 dias. O tratamento do grupo controle foi feito nas mesmas condições apenas com solução salina.

Função molecular	**Tratamento *ES**		**Tratamento **MS**	
	Controle (%)	**Tratado (%)**	**Controle (%)**	**Tratado (%)**
Ligação	54,17	52,98	46,51	61,27
Atividade catalítica	27,38	29,76	30,23	38,73
Atividade de molécula estrutural	6,55	11,31	6,98	-
Regulação de função molecular	5,36		8,53	-
Atividade transportadora	6,55	5,95	7,75	

*Tratamento ES: injeção intratumoral de 10 µL de solução de peptídeos 50 µg/µL, em xenoenxerto de células Cal27, em camundongos Balb/C nude. Os peptídeos foram gerados após a hidrólise de soro de leite por peptidase produzida pelo fungo *E. javanicum* em relação ao grupo controle tratado com água.
**Tratamento MS: injeção intratumoral de 10 µL de solução de peptídeos 50 µg/µL, em xenoenxerto de células Cal27, em camundongos Balb/C nude. Os peptídeos foram gerados após a hidrólise de soro de leite por peptidase produzida pelo fungo *M. thermophila* em relação ao grupo controle tratado com água.

Os grupos controle, comparado tanto com o tratamento ES quanto com o tratamento MS, apresentaram uma distribuição da porcentagem de funções moleculares das sequências identificadas similares. As principais funções moleculares foram atividades de ligação e catalítica.

Em relação aos grupos tratados, em ambos os tratamentos, as principais funções moleculares das sequências também foram atividades de ligação e catalítica, entretanto houve uma redução na diversidade de funções, principalmente no tratamento MS, cujas funções foram restritas às anteriormente citadas.

Após a análise inicial, as funções moleculares foram avaliadas de modo mais específico. O filtro de *nodescore* foi ajustado com o objetivo de restringir os principais mecanismos envolvidos no efeito de peptídeos bioativos sobre as células Cal27 nos ensaios *in vivo*. Nos tratamentos ES e MS apenas proteínas com escore > 15 ou > 5 foram selecionadas, respectivamente.

Na Tabela 29 estão as funções moleculares do tratamento ES, cujas sequências obtiveram maiores escores.

Tabela 29. Categorização por escore das funções moleculares das sequências proteicas identificadas no proteoma do tumor de células Cal27 após o tratamento com 500 µg de peptídeos bioativos ES a cada 48 horas durante 82 dias.

Função molecular	**Controle**	**Tratamento (*ES)**
Atividade de molécula estrutural	16,40	27,40
Ligação de íon metálico	-	25,92
Ligação de proteína do citoesqueleto	-	24,08
Ligação de poli(A) RNA	27,96	19,92
Ligação de ATP	17,00	19,00
Atividade de ATPase	-	17,96
Atividade de transportador	-	15,80
Ligação de enzimas	34,27	-
Ligação de DNA	17,53	-

Estas classificações foram estabelecidas após análises realizadas com auxílio do *software* Blast2GO Basic. Filtro para *nodescore* das sequências > 15.
*Tratamento ES: injeção intratumoral de 10 µL de solução de peptídeos 50 µg/µL, em xenoenxerto de células Cal27, em camundongos Balb/C nude. Os peptídeos foram gerados após a hidrólise de soro de leite por peptidase produzida pelo fungo *E. javanicum* em relação ao grupo controle tratado com água.

Na Tabela 30 estão as funções moleculares do tratamento MS, cujas sequências obtiveram maiores escores.

Tabela 30. Categorização por escore das funções moleculares das sequências proteicas identificadas no proteoma do tumor de células Cal27 após o tratamento com 500 µg de peptídeos bioativos MS a cada 48 horas durante 82 dias.

Função molecular	**Controle**	**Tratamento (*MS)**
Ligação de enzimas	29,89	26,38
Ligação de íon metálico	-	25,52
Ligação de poli(A) RNA	20,40	24,16
Ligação de DNA	-	21,72
Ligação de complexo proteico	9,88	20,16
Atividade de dimerização proteica	-	19,20
Ligação de receptor	17,82	17,63
Ligação de ATP	9,00	17,00
Ligação específica ao domínio de proteína	8,40	17,00
Ligação de proteína idêntica	-	15,60
Ligação de GTP	8,00	11,00
Ligação de proteína do citoesqueleto	-	9,12
Atividade de nucleosídeo trifosfatase	-	8,65
Atividade de endopeptidase	-	7,92
Atividade de transferase	-	6,32
Atividade de ATPase	7,96	-
Atividade de GTPase	6,00	-
Atividade de homodimerização de proteína	8,00	-
Atividade de molécula estrutural	13,80	-

Estas classificações foram estabelecidas após análises realizadas com auxílio do *software* Blast2GO Basic. Filtro para *nodescore* das sequências > 5.
*Tratamento MS: injeção intratumoral de 10 µL de solução de peptídeos 50 µg/µL, em xenoenxerto de células Cal27, em camundongos Balb/C nude. Os peptídeos foram gerados após a hidrólise de soro de leite por peptidase produzida pelo fungo *M. thermophila* em relação ao grupo controle tratado com água.

Os grupos controle do tratamento ES (Tabela 29) e do tratamento MS (Tabela 30) apresentaram uma maior quantidade de sequências envolvidas com a função de ligação (Tabela 28) e as sequências com maior escore também foram similares e estão envolvidas na ligação de enzimas. A função de ligação de íon metálico também se destacou nos grupos tratados das duas modalidades de tratamento. Aqui destacamos os pontos comuns, embora seja notória a diversidade de perfis entre as funções moleculares das sequências com maiores escores.

4.6.2. Efeito do tratamento com peptídeos bioativos sobre os processos biológicos de células Cal27 *in vivo*

As proteínas identificadas foram submetidas ao Blast2GO para a classificação funcional e determinação do processo biológico. Na Tabela 31 é possível ver os processos biológicos nos quais as sequências identificadas nos grupos controle e tratado dos tratamentos ES e MS estão envolvidas.

Tabela 31. Classificação dos processos biológicos nos quais as sequências proteicas identificadas no proteoma do tumor de células Cal27 após o tratamento com 500 µg de peptídeos bioativos ES ou MS a cada 48 horas durante 82 dias.

Processo biológico	**Controle (%)**	**Tratamento *ES (%)**
Processo celular	12,50	12,40
Processo de organismo individual	11,40	11,60
Processo metabólico	10,00	8,20
Regulação biológica	8,50	8,20
Regulação de processos biológicos	8,00	7,60
Resposta a estímulo	6,50	7,00
Biogênese e organização do componente celular	6,60	6,70
Processos de organismo multicelular	4,60	6,50
Processo de desenvolvimento	4,60	5,40
Localização	5,60	5,30
Sinalização	4,40	4,70
Regulação positiva de processos biológicos	4,80	3,60
Regulação negativa de processos biológicos	4,40	3,20
Processo multi organismo	2,80	2,70
Processo de sistema imune	2,30	2,60
Adesão biológica	1,50	1,50
Processo reprodutivo	-	1,30
Reprodução		1,30
Locomoção	1,60	-
Processo biológico	**Controle (%)**	**Tratamento *MS (%)**
Processo celular	11,59	11,66
Processo de organismo individual	11,96	9,65
Processo metabólico	9,35	9,12
Regulação biológica	7,29	8,48
Regulação de processos biológicos	6,92	8,06
Resposta a estímulos	6,17	7,64
Biogênese e organização do componente celular	5,42	6,68
Processo de organismo multicelular	5,98	5,41
Localização	5,79	5,30

Processo de desenvolvimento	5,61	5,20
Sinalização	3,93	5,09
Regulação positiva de processos biológicos	4,30	4,77
Regulação negativa de processos biológicos	3,55	3,82
Processo de sistema imune	2,80	2,86
Processo multi organismo	2,43	2,44
Adesão biológica	1,68	1,38
Crescimento	-	1,27
Locomoção	2,62	1,17
Processo reprodutivo	1,31	-
Reprodução	1,31	-

*Tratamento ES: injeção intratumoral de 10 µL de solução de peptídeos 50 µg/µL, em xenoenxerto de células Cal27, em camundongos Balb/C nude. Os peptídeos foram gerados após a hidrólise de soro de leite por peptidase produzida pelo fungo *E. javanicum* em relação ao grupo controle tratado com água.
**Tratamento MS: injeção intratumoral de 10 µL de solução de peptídeos 50 µg/µL, em xenoenxerto de células Cal27, em camundongos Balb/C nude. Os peptídeos foram gerados após a hidrólise de soro de leite por peptidase produzida pelo fungo *M. thermophila* em relação ao grupo controle tratado com água.

Nos tratamentos ES e MS, as proteínas do grupo controle e do grupo tratado estão distribuídas de forma similar entre os processos metabólicos e atuam, prioritariamente, em processos celulares. De modo exclusivo, no tratamento ES, o grupo controle possui proteínas envolvidas no processo de locomoção, enquanto que no grupo tratado são observadas proteínas envolvidas com reprodução. Já no tratamento MS, de modo exclusivo, o grupo controle possui proteínas envolvidas no processo de reprodução, enquanto que no grupo tratado são observadas proteínas envolvidas com crescimento.

Após a análise inicial, os processos biológicos foram avaliados de modo mais específico. O filtro de *nodescore* foi ajustado com o objetivo de restringir os principais mecanismos envolvidos no efeito de peptídeos bioativos sobre as células Cal27 nos ensaios *in vivo*. Nos tratamentos ES e MS apenas proteínas com escore > 15 ou > 5 foram selecionadas, respectivamente.

Na Tabela 32 estão os processos biológicos do tratamento ES, cujas sequências obtiveram maiores escores.

Tabela 32. Categorização por escore dos processos biológicos das sequências proteicas identificadas no proteoma do tumor de células Cal27 após o tratamento com 500 µg de peptídeos bioativos ES a cada 48 horas durante 82 dias.

Processos biológicos	**Controle**	**Tratamento (*ES)**
Processo de apoptose	19,46	28,00
Complexo de montagem proteico	32,00	26,74
Sinal de transdução intracelular	22,78	25,85
Transporte de proteína	-	25,62
Contração muscular	-	22,09
Tradução	17,10	21,63
Transporte mediado por vesículas	27,97	19,71
Proteólise	-	19,31
Desenvolvimento de órgão animal	-	19,08
Organização de citoesqueleto	-	18,87
Transporte de íon	-	18,73
Regulação de transcrição DNA-modelo	-	17,65
Processo viral	-	16,30
Adesão celular	15,26	16,20
Processo de apoptose	19,46	28,00
Complexo de montagem proteico	32,00	26,74

Estas classificações foram estabelecidas após análises realizadas com auxílio do *software* Blast2GO Basic. Filtro para *nodescore* das sequências > 15.
*Tratamento ES: injeção intratumoral de 10 µL de solução de peptídeos 50 µg/µL, em xenoenxerto de células Cal27, em camundongos Balb/C nude. Os peptídeos foram gerados após a hidrólise de soro de leite por peptidase produzida pelo fungo *E. javanicum* em relação ao grupo controle tratado com água.

Na Tabela 33 estão os processos biológicos do tratamento MS, cujas sequências obtiveram maiores escores.

Tabela 33. Categorização por escore dos processos biológicos das sequências proteicas identificadas no proteoma do tumor de células Cal27 após Cal27 após o tratamento com 500 µg de peptídeos bioativos MS a cada 48 horas durante 82 dias.

Processos biológicos	**Controle**	**Tratamento (*MS)**
Regulação de transcrição DNA-modelo	8.02	29.31
Adesão celular	12.96	25.75
Resposta celular ao estresse	14.28	24.72
Transporte mediado por vesícula	10.43	23.04
Processo viral	11.68	22.11
Fosforilação de proteína	6.43	15.48
Regulação de processo apoptótico	7.55	14.32
Processamento de RNA	6.98	12.91
Organização de organela de organismo individual	8.96	11.87
Organização de citoesqueleto	8.53	10.86
Hematopoese	7.25	-

Processo catabólico de organismo individual	2.48	-
Processo de oxi-redução	8.43	-
Processo metabólico de lipídeo	7.31	-
Regulação de biogênese de componente celular	5.52	-
Regulação de migração celular	6.82	-
Regulação negativa de expressão gênica	9.55	-
Regulação positiva de sinal de transdução intracelular	5.11	-
Resposta de defesa	5.01	-
Tradução	19.04	-
Transporte de íon	-	22.93
Desenvolvimento de órgão animal	-	19.27
Proteólise envolvida em processo catabólico de proteína celular	-	16.67
Regulação de ciclo celular	-	15.91
Resposta imune inata	-	15.81
Complexo de montagem proteico	-	15.43
Transporte de organismo individual	-	15.25
Morfogênese de projeção celular	-	15.20
Transporte intracelular de proteína	-	15.10
Locomoção	-	13.96
Resposta a peptídeo	-	13.59
Resposta celular a compostos contendo oxigênio	-	12.57
Regulação positiva de componente de organização celular	-	11.74
Regulação de desenvolvimento de projeção de neurônio	-	11.49
Morfogênese celular envolvida na diferenciação	-	10.73
Processo de ciclo celular mitótico	-	10.27
Crescimento	-	9.98
Desenvolvimento de epitélio	-	9.92
Complexo de montagem macromolecular celular	-	9.76
Resposta a composto cíclico orgânico	-	8.34
Resposta a estímulo abiótico	-	7.81
Resposta a estimulo externo	-	7.33
Via de sinalização de receptor transmembrana de proteína tirosino quinase	-	7.30
Processo metabólico de peptídeo	-	6.90
Formação da estrutura anatômica envolvida na morfogênese	-	6.71
Localização de proteína de organela	-	6.59
Regulação positiva de processo de organismo multi celular	-	6.21
Regulação de transporte	-	5.92
Regulação positiva de diferenciação celular	-	5.67
Processo biossintético de composto de ornanonitrogênio	-	5.54
Regulação negativa a resposta de estímulo	-	5.19

*Tratamento MS: injeção intratumoral de 10 µL de solução de peptídeos 50 µg/µL, em xenoenxerto de células Cal27, em camundongos Balb/C nude. Os peptídeos foram

gerados após a hidrólise de soro de leite por peptidase produzida pelo fungo *M. thermophila* em relação ao grupo controle tratado com água.

Conforme apresentado na Tabela 31, no tratamento ES as proteínas do grupo controle e do grupo tratado estão classificadas em processos biológicos similares, mas principalmente em processos celulares. Por outro lado, quando ocorre a categorização por escores das sequências é possível observar uma maior diversidade de processos biológicos no grupo controle e o maior escore vinculado ao complexo de montagem proteico. De modo interessante, no grupo tratado o processo de apoptose teve destaque, o que em conjunto com outros dados reforça a eficiência do tratamento com peptídeos bioativos.

No tratamento MS, a categorização por escores das sequências mostra a diversidade de processos biológicos envolvidos nos grupos controle e tratado. No grupo controle o maior escore está vinculado ao processo de tradução de proteínas, já no grupo tratado, o maior escore está relacionado à regulação da transcrição. Além disso, é importante salientar que, de forma comparativa, os escores vinculados à regulação do processo apoptótico, resposta celular a estresse e proteólise envolvida em processo catabólico, reforçam a evidência de morte celular por apoptose.

Outro mecanismo de defesa que os peptídeos bioativos pode estar desencadeando, é um maior controle na mitose. Em ambos os tratamentos proteínas de verificação de mitose estão presentes, estas proteínas protegem a mitose contra a segregação cromossômica, o que retardada a progressão do ciclo celular através de mitose para diminuir a chance de erros na divisão. Defeitos nestas proteínas geram aneuploidia, teor anormal de cromossomo, o qual pode facilitar a tumorigênese (KOPS; WEAVER; CLEVELAND, 2005).

Outros autores observaram proteínas derivadas do leite que apresentaram atividade biológica contra células tumorais relacionada com morte celular. De acordo com Hartmann e Meisel (2007) e Phelan et al. (2009), peptídeos derivados de leite têm demonstrado desencadear apoptoses, especialmente em células malignas, células normais parecem ser menos suscetíveis (HARTMANN; MEISEL, 2007; PHELAN et al., 2009). Wang et al. (2013) observaram que fragmentos de β-caseína (f63-68) inibiram parcialmente a proliferação de células de câncer de ovário humano promovendo apoptose por dificultar a via BCL2. Azevedo et al. (2012) também observaram o efeito de fragmentos de β-caseína (f41-45) em células tumorais, células B16F10 de melanoma na presença destes peptídeos, por 24 horas, apresentaram potencial efeito com IC_{50} 1,7 µM. Além disso, Kampa et al. (1996) observou que hidrolisados de α_{S1} casomorfinas (f150-162 de α_{S1} caseína) induziram a necrose de linhagens de células B e T de leucemia (KAMPA et al., 1996).

Além de hidrolisados de caseína, outros derivados de proteínas do leite apresentaram atividade contra células tumorais. Roy et al. (2002) relatou que hidrolisados de lactoferrina bovina (f17-38) induziram a inibição da proliferação de células HL-60 por apoptose (ROY et al., 2002). Eliassen et al. (2002) também relataram a atividade antitumoral de hidrolisados de lactoferrina bovina (f17-41), por atividade citotóxica contra linhagens de células de fibrosarcoma, melanoma e carcinoma de cólon. De acordo com Furlong et al. 2006, a lactoferrina bovina sintética induziu apoptose em linhagens de células cancerígenas de câncer de mama MDA-MDB-435 (FURLONG et al., 2006). Eliassen et al. 2006 observou que hidrolisados de lactoferrina bovina mostrou atividade citotóxica *in vitro* e in vivo contra linhagem de células de neuroblastoma, Kelly, SK-N-DZ e IMR-32 devido a clivagem das caspases 6, 7 e 9, seguido de morte celular.

Os peptídeos derivados de proteínas de leite que apresentam atividade anti cancerígena, em sua maioria, são pequenas moléculas carregadas positivamente, e estas interagem eletrostaticamente com componentes carregados negativamente da membrana celular, sendo este o maior fator de seletividade em causar danos a células cancerígenas. A relação estrutura atividade e o mecanismo preciso de ação destes peptídeos continuam sendo elucidados (LI; YU, 2015).

5. CONCLUSÕES

As peptidases isoladas do bioprocesso submerso dos fungos *Eupenicillium javanicum* e *Myceliophthora thermophila* apresentaram algumas diferenças nas características bioquímicas e de especificidade, consequentemente, atuam de forma diferente na presença de determinados substratos proteicos, e produzem fragmentos de proteínas de tamanhos e sequência variáveis, os quais podem apresentar diversas atividades biológicas.

Os peptídeos obtidos apresentaram resultados promissores de inibição de viabilidade celular de células cancerígenas, a partir destes resultados, juntamente com as proteínas que foram identificadas nas células tratadas e o que já foi relatado na literatura, é sugerido que estes peptídeos bioativos atuem direta ou indiretamente na morte das células cancerígenas. É necessário um estudo proteômico mais afundo para determinar um possível mecanismo de ação, com os peptídeos bioativos isolados, identificados e com a estrutura elucidada.

6. REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. Properties and overview of immune responses. In: **Cellular and molecular Immunology**. 7th. ed. Philadelphia: Elsevier, 2007. p. 1–12.

ABIDI, F. et al. Neutral serine protease from *Penicillium italicum*. Purification, biochemical characterization, and use for antioxidative peptide preparation from *Scorpaena notata* muscle. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 174, n. 1, p. 186–205, 2014.

ABIDI, F. et al. Purification and biochemical characterization of stable alkaline protease Prot-2 from *Botrytis cinerea*. **Process biochemistry**, v. 46, n. 12, p. 2301–2310, 2011.

ADLER-NISSEN, J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 27, n. 6, p. 1256–1262, 1979.

ADRIO, J. L.; DEMAIN, A. L. Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. **Biomolecules**, v. 4, n. 1, p. 117-139, 2014.

AGYEI, D.; DANQUAH, M. K. Rethinking food-derived bioactive peptides for antimicrobial and immunomodulatory activities. **Trends in food science and technology**, v. 23, n. 2, p. 62-69, 2012.

AHMED, A. S. et al. Identification of potent antioxidant bioactive peptides from goat milk proteins. **Food research international**, v. 74, p. 80–88, 2015.

AISSAOUI, N. et al. Purification and biochemical characterization of a novel protease from *Penicillium digitatum* - Use in bioactive peptides production. **Journal of basic microbiology**, v. 54, n. 1, 2014.

AZEVEDO, R. A. et al. Antitumor effect of cationic INKKI peptide from bovine β-Casein on melanoma B16F10. **Journal of cancer therapy**, v. 3, n. 4, p. 237–244, 2012.

BAIK, J. Y. et al. Proteomic understanding of intracellular responses of recombinant chinese hamster ovary cells adapted to grow in serum-free suspension culture. **Biotechnology Progress**, v. 27, n. 6, p. 1680–1688, 2011.

BHAT, Z. F.; KUMAR, S.; BHAT, H. F. Bioactive peptides of animal origin: a review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 9, p. 5377-5392, 2015.

BONOMI, F. et al. Structural determinants of the immunomodulatory properties of the C-terminal region of bovine β-casein. **International dairy journal**, v. 21, n. 10, p. 770–776, 2011.

BOUDHRAA, Z. et al. Annexin A1 localization and its relevance to cancer. **Clinical science**, v. 130, n. 4, p. 205–20, 2016.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food science and technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.

BUNNELL, T. M. et al. β-Actin specifically controls cell growth, migration, and the G-actin pool. **Molecular biology of the cell**, v. 22, n. 21, p. 4047–58, 2011.

CAETANO-SILVA, M. E. et al. Iron-binding peptides from whey protein hydrolysates: Evaluation, isolation and sequencing by LC-MS/MS. **Food research international**, v. 71, p. 132–139, 2015.

CALDERWOOD, S. K. et al. Heat shock proteins in cancer: Chaperones of tumorigenesis. **Trends in biochemical sciences**, v. 31, n. 3, p. 164-172, 2006.

CASSATELLA, M. A.; PERRETTI, M. Immunomodulation: The promises of immunopharmacology for the development of new drugs. **Current opinion in pharmacology**, v. 6, p. 376–378, 2006.

CHAGAS, J. R.; JULIANO, L.; PRADO, E. S. Intramolecularly quenched fluorogenic tetrapeptide substrates for tissue and plasma kallikreins. **Analytical biochemistry**, v. 192, n. 2, p. 419–425, 1991.

CHANALIA, P. et al. Applications of microbial proteases in pharmaceutical industry. **Reviews in medical microbiology**, v. 22, p. 96–101, 2011.

CHANG, C. Y.; WU, K. C.; CHIANG, S. H. Antioxidant properties and protein compositions of porcine haemoglobin hydrolysates. **Food chemistry**, v. 100, n. 4, p. 1537–1543, 2007.

CHEN, Z. et al. Purification and characterization of a novel antifungal protein secreted by *Penicillium chrysogenum* from an Arctic sediment. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 97, n. 24, p. 10381–10390, 2013.

CHENG, K. et al. Purification and biochemical characterization of a serine alkaline protease TC4 from a new isolated *Bacillus alcalophilus* TCCC11004 in detergent formulations. **African journal of biotechnology**, v. 9, n. 31, p. 4942–4953, 2010.

CIAN, R. E.; VIOQUE, J.; DRAGO, S. R. Structure-mechanism relationship of antioxidant and ACE-I inhibitory peptides from wheat gluten hydrolysate fractionated by pH. **Food research international**, v. 69, p. 216–223, 2015.

COPELAND, A. R. A brief history of enzymology, In: **Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis**. New yourk, A John Wiley & Sons, Inc . 2000. P. 1-10.

CORRÊA, A. P. F. et al. Antioxidant, antihypertensive and antimicrobial properties of ovine milk caseinate hydrolyzed with a microbial protease. **Journal of the science of food and agriculture**, v. 91, n. 12, p. 2247–2254, 2011.

CORRÊA, A. P. F. et al. Hydrolysates of sheep cheese whey as a source of bioactive peptides with antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory activities. **Peptides**, v. 61, p. 48–55, 2014.

CRUZ, J. et al. Antimicrobial peptides: promising compounds against pathogenic microorganisms. **Current medicinal chemistry**, v. 21, n. 20, p. 2299–321, 2014.

DA SILVA, R. R. et al. The identification and biochemical properties of the catalytic specificity of a serine peptidase secreted by *Aspergillus fumigatus* Fresenius. **Protein and peptide letters**, v. 21, n. 7, p. 663–671, 2014.

DANIAL, N. N. et al. BAD and glucokinase reside in a mitochondrial complex that integrates glycolysis and apoptosis. **Nature**, v. 424, n. 6951, p. 952–956, 2003.

DE CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Antioxidant activities and functional properties of soy protein isolate hydrolysates obtained using microbial proteases. **International**

journal of food science and technology, v. 49, n. 2, p. 317–328, 2014.

DE GOBBA, C. et al. Antioxidant peptides from goat milk protein fractions hydrolysed by two commercial proteases. **International dairy journal**, v. 39, n. 1, p. 28–40, 2014.

DE SOUZA, P. M. et al. A biotechnology perspective of fungal proteases. **Brazilian journal of microbiology**, v. 46, n. 2, p. 337–46, 2015.

DEVI, M. K. et al. Purification, characterization of alkaline protease enzyme from native isolate *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents. **Indian journal of science and technology**, v. 1, n. 7, p. 1–6, 2008.

DI BERNARDINI, R. et al. Isolation, purification and characterization of antioxidant peptidic fractions from a bovine liver sarcoplasmic protein thermolysin hydrolyzate. **Peptides**, v. 32, n. 2, p. 388–400, 2011.

DOWNWARD, J. Cell biology: metabolism meets death. **Nature**, v. 424, n. 6951, p. 896–7, 2003.

DUNN, B. M. Determination of protease mechanism. In: BEYNON, R. J.; BOND, J. S. **Proteolytic enzymes: a practical approach**. Great Britain: IRL Press, 1989. p. 57–81.

EL-GENDY, M. M. A. Keratinase production by endophytic *Penicillium* spp. Morsy1 under solid-state fermentation using rice straw. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, n. 3, p. 780–794, 2010.

ELIASSEN, L. T. et al. Evidence for a direct antitumor mechanism of action of bovine lactoferricin. **Anticancer research**, v. 22, n. 5, p. 2703–2710, 2002.

ELIASSEN, L. T. et al. The antimicrobial peptide, lactoferricin B, is cytotoxic to neuroblastoma cells in vitro and inhibits xenograft growth in vivo. **International journal of cancer**, v. 119, n. 3, p. 493–500, 2006.

ERDMANN, K.; CHEUNG, B. W. Y.; SCHRÖDER, H. The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 19, n. 10, p. 643–654, 2008.

FITZGERALD, R. J.; MEISEL, H. Milk protein-derived peptide inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme. **The british journal of nutrition**, v. 84, p. 33–37,

2000.

FITZGERALD, R. J.; MURRAY, B. A. Bioactive peptides and lactic fermentations. **International journal of dairy technology**, v. 59, n. 2, p. 118-125, 2006.

FONTOURA, R. et al. Production of feather hydrolysates with antioxidant, angiotensin-I converting enzyme- and dipeptidyl peptidase-IV-inhibitory activities. **New biotechnology**, v. 31, n. 5, p. 506–513, 2014.

FURLONG, S. J.; MADER, J. S.; HOSKIN, D. W. Lactoferricin-induced apoptosis in estrogen-nonresponsive MDA-MB-435 breast cancer cells is enhanced by C6 ceramide or tamoxifen. **Oncology Reports**, v. 15, n. 5, p. 1385–1390, 2006.

GANAPATHY-KANNIAPPAN, S.; GESCHWIND, J.-F. H. Tumor glycolysis as a target for cancer therapy: progress and prospects. **Molecular cancer**, v. 12, p. 152, 2013.

GILAR, M. et al. Two-dimensional separation of peptides using RP-RP-HPLC system with different pH in first and second separation dimensions. **Journal of separation science**, v. 28, n. 14, p. 1694–1703, 2005.

GILL, H. S. et al. Immunoregulatory peptides in bovine milk. **The british journal of nutrition**, v. 84, n. 1, p. S111–S117, 2000.

GRAHN, S. et al. S′ subsite mapping of serine proteases based on fluorescence resonance energy transfer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein structure and molecular enzymology**, v. 1431, n. 2, p. 329–337, 1999.

GRAMINHO, E. R. et al. Purification, characterization, and specificity determination of a new serine protease secreted by *Penicillium waksmanii*. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 169, n. 1, p. 201–214, 2013.

GUO, C.; LIU, S.; SUN, M. Z. Novel insight into the role of GAPDH playing in tumor. **Clinical and translational oncology**, v. 15, n. 3, p. 167-172, 2013.

GUPTA, R. et al. An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 60, n. 4, p. 381-395, 2002.

GUPTA, Y. et al. Macrophage migration inhibitory factor secretion is induced by ionizing radiation and oxidative stress in cancer cells. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, 2016.

GURBUXANI, S. et al. Heat shock protein 70 binding inhibits the nuclear import of apoptosis-inducing factor. **Oncogene**, v. 22, n. 43, p. 6669–6678, 2003.

HADDAR, A. et al. Two detergent stable alkaline serine-proteases from *Bacillus mojavensis* A21: Purification, characterization and potential application as a laundry detergent additive. **Bioresource technology**, v. 100, n. 13, p. 3366–3373, 2009.

HAMIN NETO, Y. A. A. et al. Determination of specificity and biochemical characteristics of neutral protease isolated from *Myceliophthora thermophila*. **Protein and peptide letters**, v. 22, n. 11, p. 972–82, 2015.

HAMIN NETO, Y. A. A.; DE FREITAS, L. A. P.; CABRAL, H. Multivariate analysis of the stability of spray-dried *Eupenicillium javanicum* peptidases. **Drying technology**, v. 32, n. 5, p. 614–621, 4 abr. 2014.

HAMIN NETO, Y. A. A; MOTTA, C. M. S.; CABRAL, H. Optimization of metalloprotease production by *Eupenicillium javanicum* in both solid state and submerged bioprocesses. **African journal of biochemistry research**, v. 7, n. 8, p. 146–157, 2013.

HAQUE, E.; CHAND, R. Antihypertensive and antimicrobial bioactive peptides from milk proteins. **European food research and technology**, v. 227, p. 7–15, 2008.

HARTMANN, R.; MEISEL, H. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. **Current opinion in biotechnology**, v. 18, n. 2, p. 163-169, 2007.

HATANAKA, T.; UESUGI, J. A. Y.; IWABUCHI, M. Purification, characterization cloning, and sequencing of metalloendopeptidase from *Streptomyces septatus* TH-2. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 434, n. 2, p. 289–298, 2005.

HERNANDEZ-MARTINEZ, R. et al. Purification and characterization of a thermodynamic stable serine protease from *Aspergillus fumigatus*. **Process biochemistry**, v. 46, p. 2001–2006, 2011.

HIRATA, I. et al. Internally quenched fluorogenic protease substrates: Solid-phase synthesis and fluorescence spectroscopy of peptides containing ortho-

aminobenzoyl/dinitrophenyl groups as donor-acceptor pairs. **Letters in peptide science**, v. 1, p. 299–308, 1995.

ISRAELSON, A. et al. Macrophage migration inhibitory factor as a chaperone inhibiting accumulation of misfolded SOD1. **Neuron**, v. 86, n. 1, p. 218–232, 2015.

ITAKURA, M. et al. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase aggregation inhibitor peptide: A potential therapeutic strategy against oxidative stress-induced cell death. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 467, n. 2, p. 373–376, 2015.

IYER, S. S. et al. Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the Nlrp3 inflammasome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 48, p. 20388–20393, 2009.

JEGO, G. et al. Targeting heat shock proteins in cancer. **Cancer letters**, v. 332, n. 2, p. 275–285, 2013.

JEMLI, S. et al. Biocatalysts: application and engineering for industrial purposes. **Critical reviews in biotechnology**, v. 8551, p. 1–13, 2014.

KAMPA, M. et al. Identification of a novel opioid peptide (Tyr-Val-Pro-Phe-Pro) derived from human alpha S1 casein (alpha S1-casomorphin, and alpha S1-casomorphin amide). **The biochemical journal**, v. 319, p. 903–908, 1996.

KATSIMPOURAS, C. et al. A thermostable GH26 endo-β-mannanase from *Myceliophthora thermophila* capable of enhancing lignocellulose degradation. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, n. 19, p. 8385–8397, 2016.

KHAN, M. A. et al. Isolation and screening of alkaline protease producing bacteria and physio-chemical characterization of the enzyme. **African journal of biotechnology**, v. 10, p. 6203–6212, 2011.

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

KLEMENCIC, I. et al. Biochemical characterization of human cathepsin X revealed that the enzyme is an exopeptidase, acting as carboxymonopeptidase or carboxydipeptidase. **European journal of biochemistry**, v. 267, n. 17, p. 5404–5412, 2000.

KONG, X. Z.; GUO, M. M.; HUA, Y. F. Enzymatic preparation of immunomodulating hydrolysates from soy proteins. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 8873–8879, 2008.

KONIECZNA, A. et al. Enzymes of the central carbon metabolism: Are they linkers between transcription, DNA replication, and carcinogenesis? **Medical Hypotheses**, v. 84, n. 1, p. 58–67, 2015.

KOOL, M. M. et al. Characterization of an acetyl esterase from *Myceliophthora thermophila* C1 able to deacetylate xanthan. **Carbohydrate polymers**, v. 111, p. 222–229, 2014.

KOPS, G. J.; WEAVER, B. A.; CLEVELAND, D. W. On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. **Nature reviews cancer**, v. 5, n. 10, p. 773–785, 2005.

KORHONEN, H. Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. **Journal of functional foods**, v. 1, n. 2, p. 177–187, 2009.

KOUSHYAR, S.; JIANG, W. G.; DART, D. A. Unveiling the potential of prohibitin in cancer. **Cancer letters**, v. 369, n. 2, p. 316-322, 2015.

KRENSKY, A. M.; BENNETT, W. M.; VINCENTI, F. Immunosuppressants, Tolerogens, and Immunostimulants. In: GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. (Eds.). . **The pharmacological basis of therapeutics: a textbook of pharmacology**. New York: Macmillan Publishing Co., 2011. p. 1005–1029.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.

LEE, A. S. Glucose-regulated proteins in cancer: molecular mechanisms and therapeutic potential. **Nature reviews cancer**, v. 14, n. 4, p. 263–76, 2014.

LEMES, A. C. et al. A review of the latest advances in encrypted bioactive peptides from protein-rich waste. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 950, p. 1–24, 2016.

LI, Y.; YU, J. Research progress in structure-activity relationship of bioactive peptides. **Journal of medicinal food**, v. 18, n. 2, p. 147–56, 2015.

LIANOS, G. D. et al. The role of heat shock proteins in cancer. **Cancer letters**, v. 360,

n. 2, p. 114–118, 2015.

LI-CHAN, E. C.; EUNICELI-CHAN, E. C. Bioactive peptides and protein hydrolysates: research trends and challenges for application as nutraceuticals and functional food ingredients. **Current opinion in food science**, v. 1, p. 28–37, 2015.

LIU, Q. et al. Purification and characterization of a protease produced by a *Planomicrobium* sp. L-2 from gut of *Octopus vulgaris*. **Preventive nutrition and food science**, v. 18, p. 273–279, 2013.

LIZARDO, M. M. et al. Upregulation of glucose-regulated protein 78 in metastatic cancer cells is necessary for lung metastasis progression. **Neoplasia**, v. 18, n. 11, p. 699-710, 2016.

LORENTE, G.; SYRIANI, E.; MORALES, M. Actin filaments at the leading edge of cancer cells are characterized by a high mobile fraction and turnover regulation by profilin I. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, 2014.

LUI, J. C. K.; KONG, S. K. Heat shock protein 70 inhibits the nuclear import of apoptosis-inducing factor to avoid DNA fragmentation in TF-1 cells during erythropoiesis. **FEBS Letters**, v. 581, n. 1, p. 109–117, 2007.

MAES, E. et al. Proteomics in cancer research: Are we ready for clinical practice? **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 96, n. 3, p. 437–448, 2015.

MAJUMDER, R.; BANIK, S. P.; KHOWALA, S. Purification and characterisation of κ-casein specific milk-clotting metalloprotease from *Termitomyces clypeatus* MTCC 5091. **Food chemistry**, v. 173, p. 441–448, 2015.

MARQUES, M. R. et al. Proteolytic hydrolysis of cowpea proteins is able to release peptides with hypocholesterolemic activity. **Food research international**, v. 77, p. 43–48, 2015.

MEISEL, H. Biochemical properties of bioactive peptides derived from milk proteins: Potential nutraceuticals for food and pharmaceutical applications. **Livestock production science**, v. 50, n. 1–2, p. 125–138, 1997.

MERHEB, C. W. et al. Partial characterization of protease from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*, and its hydrolytic activity on bovine casein. **Food chemistry**, v. 104, n. 1, p. 127–131, 2007.

MERHEB-DINI, C. et al. Biochemical and functional characterization of a metalloprotease from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, n. 19, p. 9210–9217, 2009.

MINE, Y. Egg proteins and peptides in human health-chemistry, bioactivity and production. **Current pharmaceutical design**, v. 13, n. 9, p. 875–884, 2007.

MIRAKABADI, A. Z. et al. Necrotic effect versus apoptotic nature of Camptothecin in human cervical cancer cells. **Iranian Journal of Cancer Prevention**, v. 5, n. 3, p. 109–116, 2012.

MOHANTY, D. P. et al. Milk derived bioactive peptides and their impact on human health – A review. **Saudi journal of biological sciences**, v. 23, n. 5, p. 577–583, 2015.

NAKADATE, S. et al. Antifungal cyclic depsipeptide, eujavanicin A, isolated from *Eupenicillium javanicum*. **Journal of natural products**, v. 71, n. 9, p. 1640–1642, 2008.

NAKADATE, S. et al. Eujavanicols A-C, decalin derivatives from *Eupenicillium javanicum*. **Journal of natural products**, v. 70, n. 9, p. 1510–1512, 2007.

NONGONIERMA, A. B.; FITZGERALD, R. J. Strategies for the discovery, identification and validation of milk protein-derived bioactive peptides. **Trends in food science and technology**, v. 50, p. 26–43, 2016.

O'BRIEN, J. et al. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 17, p. 5421–5426, 2000.

O'NEILL, J. Antimicrobial resistance : Tackling a crisis for the health and wealth of nations. **Review on antimicrobial resistance**, p. 1–16, 2014.

OH, G. W. et al. A novel peptide purified from the fermented microalga *Pavlova lutheri* attenuates oxidative stress and melanogenesis in B16F10 melanoma cells. **Process biochemistry**, v. 50, n. 8, p. 1318–1326, 2015.

OLIVEIRA, J. R. et al. Specificity studies on Kallikrein related peptidase 7 (KLK7) and effects of osmolytes and glycosaminoglycans on its peptidase activity. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1854, n. 1, p. 73–83, 2015.

OZBEN, T. Oxidative stress and apoptosis: Impact on cancer therapy. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, n. 9, p. 2181-2196, 2007.

PAPAGIANNI, M.; SERGELIDIS, D. Purification and biochemical characterization of a novel alkaline protease produced by *Penicillium nalgiovense*. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 172, n. 8, p. 3926–3938, 2014.

PESCHEL, A.; SAHL, H. G. The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. **Nature reviews microbiology**, v. 4, n. 7, p. 529–536, 2006.

PHELAN, M. et al. Potential bioactive effects of casein hydrolysates on human cultured cells. **International dairy journal**, v. 19, n. 5, p. 279–285, 2009.

PLAISANCIÉ, P. et al. A novel bioactive peptide from yoghurts modulates expression of the gel-forming MUC2 mucin as well as population of goblet cells and Paneth cells along the small intestine. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 1, p. 213–221, 2013.

PROKORNÝ, J. Natural antioxidants for food use. **Trends in food science and technology**, v. 2, p. 223-227, 1991.

RAHMAWATI, I. S.; SUNTORNSUK, W. Effects of fermentation and storage on bioactive activities in milks and yoghurts. **Procedia chemistry**, v. 18, p. 53–62, 2016.

RAI, S. K.; MUKHERJEE, A. K. Optimization of production of an oxidant and detergent-stable alkaline β-keratinase from *Brevibacillus* sp. strain AS-S10-II: Application of enzyme in laundry detergent formulations and in leather industry. **Biochemical engineering journal**, v. 54, n. 1, p. 47–56, 2011.

RANI, K.; RANA, R.; DATT, S. Review on latest overview of proteases. **International journal of current life sciences**, v. 2, n. 1, p. 13–18, 2012.

RAO, M. B. et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 62, n. 3, p. 597–635, 1998.

RAWLINGS, N. D.; MORTON, F. R.; BARRETT, A. J. An introduction to peptidases and the merops database. In: **Industrial enzymes: Structure, function and applications**. 2007. p. 161–179.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free radical biology and medicine**, v. 26, n. 9–10, p. 1231–1237, 1999.

REYES-DÍAZ, A. et al. Péptidos inmunomoduladores derivados de las proteínas de la leche. **Interciencia**, v. 41, n. 2, p. 84–91, 2016.

RICCARDI, C.; MIGLIORATI, G. Pharmacological modulation of the imune system. In: CLEMENTI, L.; FUMAGALI, G. (Eds.). **General and molecular pharmacology – Principles of drug action**. 1st. ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2015. p. 625–640.

RIGO, A. et al. Interaction of copper with cysteine: stability of cuprous complexes and catalytic role of cupric ions in anaerobic thiol oxidation. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 98, n. 9, p. 1495–1501, 2004.

ROBINSON, G. L. et al. Switching from aerobic glycolysis to oxidative phosphorylation modulates the sensitivity of mantle cell lymphoma cells to TRAIL. **Oncogene**, v. 31, n. 48, p. 4996–5006, 2012.

ROY, M. K. et al. Peptides from the N-terminal end of bovine lactoferrin induce apoptosis in human leukemic (HL-60) cells. **Journal of dairy science**, v. 85, n. 9, p. 2065–74, 2002.

SANCHEZ, S.; DEMAIN, A. L. Enzymes and bioconversions of industrial, pharmaceutical, and biotechnological significance. **Organic process research and development**, v. 15, n. 1, p. 224–230, 2011.

SANDHYA, C. et al. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. **Process biochemistry**, v. 40, n. 8, p. 2689–2694, 2005.

SANTOS, J. A. N. **Inibição e especificidade da Lb_{pro} do vírus da febre aftosa**. Universidade Federal de São Paulo (tese) 93p, 2009.

SARATH G., DE LA MOTTE, R.S.; WAGNER, F. W. Protease assay methods. In: **Proteolytic enzymes: a practical approach**. New York: Oxford University, 1996. p. 45-76.

SAVITHA, S. et al. Fungal protease: Production, purification and compatibility with laundry detergents and their wash performance. **Journal of the taiwan institute of**

chemical engineers, v. 42, n. 2, p. 298–304, 2011.

SCHECHTER, I.; BERGER, A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 27, n. 2, p. 157–162, 1967.

SEE, Y. S.; JACKOWSKI, G. Estimating molecular weights of polypeptides by SDS gel electrophoresis. In: CREIGTON, T. E. (Ed.). **Protein structure a practical approach**. Second edition. New york: Oxford University, 1989. p. 1–19.

SEONG, C. N. et al. Production, purification, and characterization of a novel thermostable serine protease from soil isolate, *Streptomyces tendae*. **Biotechnology letters**, v. 26, n. 11, p. 907–909, 2004.

SHANKAR, S.; RAO, M.; LAXMAN, R. S. Purification and characterization of an alkaline protease by a new strain of *Beauveria* sp. **Process biochemistry**, v. 46, n. 2, p. 579–585, 2011.

SHENG, W. et al. Overexpression of Calreticulin contributes to the development and progression of pancreatic cancer. **Journal of cellular physiology**, v. 229, n. 7, p. 887–897, 2014.

SHIRASAKA, N. et al. Purification and characterization of a fibrinolytic protease from *Aspergillus oryzae* KSK-3. **Mycoscience**, v. 53, n. 5, p. 354–364, 2012.

SIEVERS, C. et al. Prohibitins are required for cancer cell proliferation and adhesion. **PLoS ONE**, v. 5, n. 9, p. 1–9, 2010.

SILVA, T. A. S. et al. Purification and some properties of an extracellular acid protease from *Aspergillus clavatus*. **World journal of microbiology and biotechnology**, v. 27, n. 11, p. 2491–2497, 2011.

SIMICZYJEW, A. et al. Effect of overexpression of β- and γ-actin isoforms on actin cytoskeleton organization and migration of human colon cancer cells. **Histochemistry and cell biology**, v. 142, n. 3, p. 307–322, 2014.

SINHA, S.; SINHA, S. Studies on the production of acid protease by submerged fermentation. **International journal of food engineering**, v. 5, n. 1, 2009.

SRILAKSHMI, J. et al. Commercial potential of fungal protease : Past , present and future

prospects. **Journal of pharmaceutical, chemical and biological sciences**, v. 2, p. 218–234, 2015.

SUN, H.; JENSSEN, H. Milk derived peptides with immune stimulating antiviral properties. In: WALTER, H. L. (Ed.). **Milk protein**. 1st. edition. InTech, 2012. p. 45–82.

TAKADA, H.; KURISAKI, A. Emerging roles of nucleolar and ribosomal proteins in cancer, development, and aging. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 72, n. 21, p. 4015–4025, 2015.

TAO, N. GUO et al. Production of feed enzymes from citrus processing waste by solid-state fermentation with *Eupenicillium javanicum*. **International journal of food science and technology**, v. 46, n. 5, p. 1073–1079, 2011.

THYS, R. C. S.; BRANDELLI, A. Purification and properties of a keratinolytic metalloprotease from *Microbacterium* sp. **Journal of applied microbiology**, v. 101, n. 6, p. 1259–1268, 2006.

TRAN, L. H.; NAGANO, H. Isolation and characteristics of *Bacillus subtilis* CN2 and its collagenase production. **Journal of food science**, v. 67, n. 3, p. 1184–1187, 2002.

TUNGA, R.; SHRIVASTAVA, B.; BANERJEE, R. Purification and characterization of a protease from solid state cultures of *Aspergillus parasiticus*. **Process biochemistry**, v. 38, n. 11, p. 1553–1558, 2003.

UDENIGWE, C. C.; ALUKO, R. E. Food protein-derived bioactive peptides: Production, processing, and potential health benefits. **Journal of food science**, v. 77, n. 1, p. R11-24, 2012.

VATOLIN, S. et al. Novel protein disulfide isomerase inhibitor with anti-cancer activity in multiple myeloma. **Cancer research**, v. 76, n. 12, p. 3340-3350, 2016.

VAVRUSOVA, M. et al. Characterisation of a whey protein hydrolysate as antioxidant. **International Dairy Journal**, v. 47, p. 86–93, 2015.

VELOORVALAPPIL, N. J. et al. Versatility of microbial proteases. **Advances in Enzyme Research**, v. 1, n. 3, p. 39–51, 2013.

VIEILLE, C.; ZEIKUS, G. J. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular

mechanisms for thermostability. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 65, n. 1, p. 1–43, 2001.

VISHWANATHA, K. S.; RAO, A. G. A.; SINGH, S. A. Acid protease production by solid-state fermentation using *Aspergillus oryzae* MTCC 5341: Optimization of process parameters. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 2, p. 129–138, 2010.

WANG, B.; WU, W.; LIU, X. Purification and characterization of a neutral serine protease with nematicidal activity from *Hirsutella rhossiliensis.* **Mycopathologia**, v. 163, n. 3, p. 169–176, 2007.

WANG, S. et al. Antimicrobial peptides as potential alternatives to antibiotics in food animal industry. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 5, p. 603, 2016.

WANG, S. L. et al. Optimization of conditions for protease production by *Chryseobacterium taeanense* TKU001. **Bioresource technology**, v. 99, n. 9, p. 3700–3707, 2008.

WANG, W. et al. PGPIPN, a Therapeutic hexapeptide, suppressed human ovarian cancer growth by targeting BCL2. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, 2013.

XU, S.; SANKAR, S.; NEAMATI, N. Protein disulfide isomerase: A promising target for cancer therapy. **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 3, p. 22-240, 2014.

ZAMANIAN, M. et al. Calreticulin and cancer. **Pathology and oncology research**, v. 19, n. 2, p. 149-154, 2013.

ZANPHORLIN, L. M. et al. Purification and characterization of a new alkaline serine protease from the thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. **Process biochemistry**, v. 46, n. 11, p. 2137–2143, 2011.

ZERVA, A. et al. Bioconversion of biomass-derived phenols catalyzed by *Myceliophthora thermophila* laccase. **Molecules**, v. 21, n. 5, 2016.

ZERVA, A.; CHRISTAKOPOULOS, P.; TOPAKAS, E. Characterization and application of a novel class II thermophilic peroxidase from *Myceliophthora thermophila* in biosynthesis of polycatechol. **Enzyme and microbial technology**, v. 75, p. 49–56, 2015.

ZHENG, L. et al. Practical problems when using ABTS assay to assess the radical-scavenging activity of peptides: Importance of controlling reaction pH and time. **Food chemistry**, v. 192, p. 288–294, 2016.

ZHOU, W.; LIOTTA, L. A.; PETRICOIN, E. F. Cancer metabolism and mass spectrometry-based proteomics. **Cancer letters**, v. 356, n. 2, p. 176–183, 2015.

ZHU, K.; ZHOU, H.; QIAN, H. Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. **Process biochemistry**, v. 41, n. 6, p. 1296–1302, 2006.

APÊNDICES

Apêndice I. Lista de proteínas intracelulares de linhagem celular de melanoma B16F10, após o tratamento com peptídeos derivados de proteínas do soro de leite, produzidos por hidrólise com enzima microbiana secretada pelo fungo *E. javanicum*. O tratamento foi com solução de 4 µg/µL de peptídeos, as células foram coleta após 48 horas de exposição ao tratamento, o controle foi tratado nas mesmas condições apenas água. As proteínas identificadas em ao menos duas amostras da triplicata de cada grupo foram selecionadas para a análise estatística (test T), comparando com o tratamento. As proteínas que apresentaram valor de $p < 0,05$ estão apresentadas na tabela.

Proteína	**Acesso**	**Controle (fmol)**	**Tratamento ES (fmol)**	**Valor de p**
10 kDa heat shock protein_ mitochondrial	CH10_HUMAN	144,04	60,58	0,000
15 kDa selenoprotein	SEP15_HUMAN	-	13,49	0,000
28S ribosomal protein S22_ mitochondrial	RT22_HUMAN	-	20,23	0,000
28S ribosomal protein S28_ mitochondrial	RT28_HUMAN	-	13,48	0,000
39S ribosomal protein L11_ mitochondrial	RM11_HUMAN	-	17,26	0,000
40S ribosomal protein S14	RS14_HUMAN	-	6,90	0,000
40S ribosomal protein S17-like	RS17L_HUMAN	29,06	17,53	0,008
40S ribosomal protein S20	RS20_HUMAN	-	16,18	0,000
40S ribosomal protein S27-like	RS27L_HUMAN	16,14	-	0,000
40S ribosomal protein S4_ X isoform	RS4X_HUMAN	-	6,16	0,000
40S ribosomal protein S7	RS7_HUMAN	23,08	7,99	0,000
60 kDa heat shock protein_ mitochondrial	CH60_HUMAN	310,67	197,65	0,012
60S ribosomal protein L11	RL11_HUMAN	24,30	16,35	0,025
60S ribosomal protein L30	RL30_HUMAN	19,87	28,33	0,013
78 kDa glucose-regulated protein	GRP78_HUMAN	210,05	155,14	0,025
Acetyl-CoA acetyltransferase_ mitochondrial	THIL_HUMAN	-	30,49	0,000
Actin_ cytoplasmic 1	ACTB_HUMAN	50,46	32,98	0,001
Alpha-2-HS-glycoprotein	FETUA_HUMAN	51,58	33,86	0,038
Annexin A1	ANXA1_HUMAN	-	13,29	0,000

Annexin A2	ANXA2_HUMAN	8,93	17,42	0,001
Apolipoprotein E	APOE_HUMAN	-	4,72	0,000
Apoptotic chromatin condensation inducer in the nucleus	ACINU_HUMAN	-	8,85	0,000
ATP synthase subunit alpha_ mitochondrial	ATPA_HUMAN	115,22	84,86	0,027
ATP synthase subunit beta_ mitochondrial	ATPB_HUMAN	97,34	45,09	0,001
ATP synthase subunit O_ mitochondrial	ATPO_HUMAN	81,18	51,32	0,021
ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit_ mitochondrial	CLPP_HUMAN	20,36	9,69	0,022
BAG family molecular chaperone regulator 2	BAG2_HUMAN	-	11,63	0,000
Calmodulin	CALM_HUMAN	42,94	89,81	0,001
Charged multivesicular body protein 4b	CHM4B_HUMAN	-	11,99	0,000
Citrate synthase_ mitochondrial	CISY_HUMAN	25,52	49,08	0,002
Clathrin interactor 1	EPN4_HUMAN	-	34,20	0,003
Clathrin light chain A	CLCA_HUMAN	-	19,51	0,000
Clathrin light chain B	CLCB_HUMAN	15,53	37,38	0,001
Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 5	CPSF5_HUMAN	16,80	10,68	0,008
Cofilin-1	COF1_HUMAN	41,06	27,57	0,001
CUGBP Elav-like family member 1	CELF1_HUMAN	-	7,33	0,000
CUGBP Elav-like family member 2	CELF2_HUMAN	6,43	16,73	0,010
Cyclic AMP-responsive element-binding protein 1	CREB1_HUMAN	-	8,44	0,000
Cysteine and glycine-rich protein 1	CSRP1_HUMAN	-	12,08	0,000
Cytochrome c	CYC_HUMAN	41,36	58,76	0,032
Cytochrome c oxidase subunit 5A_ mitochondrial	COX5A_HUMAN	86,85	73,05	0,037
DAZ-associated protein 1	DAZP1_HUMAN	26,73	71,62	0,000
Dihydrolipoyl dehydrogenase_ mitochondrial	DLDH_HUMAN	15,88	28,50	0,003
Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex_ mitochondrial	ODP2_HUMAN	11,48	22,58	0,005
DnaJ homolog subfamily B member 11	DJB11_HUMAN	-	8,82	0,000
Elongation factor 1-beta	EF1B_HUMAN	-	11,06	0,000
Endoplasmic reticulum resident protein 29	ERP29_HUMAN	-	31,10	0,000
Enhancer of rudimentary homolog	ERH_HUMAN	-	11,96	0,000

ES1 protein homolog_ mitochondrial	ES1_HUMAN	-	12,43	0,000
Estradiol 17-beta-dehydrogenase 8	DHB8_HUMAN	8,68	3,83	0,047
Eukaryotic translation initiation factor 4H	IF4H_HUMAN	-	4,03	0,000
Fumarate hydratase_ mitochondrial	FUMH_HUMAN	42,36	80,16	0,000
Galectin-1	LEG1_HUMAN	28,47	58,00	0,010
Gamma-enolase	ENOG_HUMAN	18,83	11,22	0,042
GTP:AMP phosphotransferase AK3_ mitochondrial	KAD3_HUMAN	12,27	30,16	0,002
Heat shock-related 70 kDa protein 2	HSP72_HUMAN	3,82	-	0,017
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0	ROA0_HUMAN	23,41	27,94	0,050
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	ROA3_HUMAN	248,32	196,95	0,014
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0	HNRPD_HUMAN	25,47	67,34	0,001
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like	HNRDL_HUMAN	10,25	27,55	0,007
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	HNRPF_HUMAN	19,39	11,90	0,018
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	HNRH1_HUMAN	112,17	74,25	0,027
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2	HNRH2_HUMAN	-	16,20	0,000
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	HNRPK_HUMAN	52,98	66,43	0,043
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	HNRPM_HUMAN	105,52	83,54	0,035
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R	HNRPR_HUMAN	17,76	24,20	0,006
High mobility group protein 20A	HM20A_HUMAN	-	4,91	0,000
Hippocalcin-like protein 1	HPCL1_HUMAN	-	5,94	0,000
Histone H2A type 1-A	H2A1A_HUMAN	17,03	-	0,000
Histone H2A type 1-B/E	H2A1B_HUMAN	-	32,85	0,001
Histone H2A.V	H2AV_HUMAN	43,97	63,84	0,031
Histone H2AX	H2AX_HUMAN	-	71,17	0,000
Histone H2B type 1-C/E/F/G/I	H2B1C_HUMAN	149,67	97,02	0,022
Histone H3.2	H32_HUMAN	102,40	-	0,000
Histone H4	H4_HUMAN	96,81	57,84	0,002
Hsc70-interacting protein	F10A1_HUMAN	-	11,67	0,000
Iron-sulfur cluster assembly 2 homolog_ mitochondrial	ISCA2_HUMAN	6,71	11,12	0,009
Keratin_ type I cytoskeletal 10	K1C10_HUMAN	-	42,11	0,000

Keratin_ type I cytoskeletal 9	K1C9_HUMAN	-	11,11	0,000
Keratin_ type II cytoskeletal 1	K2C1_HUMAN	18,74	26,50	0,028
Keratin_ type II cytoskeletal 2 epidermal	K22E_HUMAN	-	13,03	0,000
Keratin_ type II cytoskeletal 5	K2C5_HUMAN	-	11,65	0,000
Kinectin	KTN1_HUMAN	-	5,69	0,000
Leucine-rich repeat-containing protein 59	LRC59_HUMAN	46,91	31,61	0,002
LIM domain and actin-binding protein 1	LIMA1_HUMAN	-	17,43	0,000
Melanocyte protein PMEL	PMEL_HUMAN	-	16,98	0,000
Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor	MANF_HUMAN	37,39	46,60	0,018
Methyl-CpG-binding protein 2	MECP2_HUMAN	-	12,25	0,000
Methylglutaconyl-CoA hydratase_ mitochondrial	AUHM_HUMAN	13,89	17,44	0,001
Monofunctional C1-tetrahydrofolate synthase_ mitochondrial	C1TM_HUMAN	15,38	7,79	0,002
Myelin expression factor 2	MYEF2_HUMAN	20,25	31,52	0,014
Neudesin	NENF_HUMAN	31,09	44,21	0,040
NHP2-like protein 1	NH2L1_HUMAN	49,45	40,88	0,026
Non-specific lipid-transfer protein	NLTP_HUMAN	-	40,12	0,000
Nuclear pore glycoprotein p62	NUP62_HUMAN	-	6,10	0,000
Nucleolysin TIAR	TIAR_HUMAN	-	9,04	0,000
Nucleoprotein TPR	TPR_HUMAN	-	11,31	0,002
Nucleoside diphosphate kinase B	NDKB_HUMAN	51,94	34,77	0,009
Paraspeckle component 1	PSPC1_HUMAN	12,46	21,86	0,001
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	PPIA_HUMAN	103,58	80,54	0,035
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP2	FKBP2_HUMAN	17,52	30,47	0,008
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP9	FKBP9_HUMAN	-	9,55	0,000
Peroxiredoxin-1	PRDX1_HUMAN	29,64	51,98	0,002
Peroxiredoxin-5_ mitochondrial	PRDX5_HUMAN	18,00	21,13	0,024
Peroxisomal multifunctional enzyme type 2	DHB4_HUMAN	-	20,09	0,005
PHD finger-like domain-containing protein 5A	PHF5A_HUMAN	-	16,13	0,000
Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	PEBP1_HUMAN	-	10,99	0,000
Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein	PAIRB_HUMAN	-	12,79	0,000

Polyadenylate-binding protein 4	PABP4_HUMAN	-	9,74	0,000
Pre-mRNA 3'-end-processing factor FIP1	FIP1_HUMAN	-	2,87	0,000
Protein disulfide-isomerase A4	PDIA4_HUMAN	22,45	48,01	0,003
Protein disulfide-isomerase A6	PDIA6_HUMAN	-	4,23	0,000
Protein lin-7 homolog C	LIN7C_HUMAN	-	9,85	0,000
Protein S100-A11	S10AB_HUMAN	-	8,62	0,000
Putative RNA-binding protein 3	RBM3_HUMAN	27,13	31,24	0,033
Pyrroline-5-carboxylate reductase 1_ mitochondrial	P5CR1_HUMAN	15,33	10,46	0,050
Pyruvate kinase PKM	KPYM_HUMAN	19,84	9,80	0,003
Radixin	RADI_HUMAN	-	7,20	0,000
Regulation of nuclear pre-mRNA domain-containing protein 1B	RPR1B_HUMAN	-	3,78	0,000
RNA-binding protein 14	RBM14_HUMAN	16,97	25,87	0,038
RNA-binding protein 39	RBM39_HUMAN	11,56	15,04	0,037
RNA-binding protein 8A	RBM8A_HUMAN	-	5,70	0,000
RNA-binding protein EWS	EWS_HUMAN	-	39,99	0,000
RNA-binding protein FUS	FUS_HUMAN	32,05	41,18	0,033
Serine/arginine-rich splicing factor 11	SRS11_HUMAN	-	5,66	0,000
Serine/arginine-rich splicing factor 3	SRSF3_HUMAN	65,72	29,09	0,001
Serum albumin	ALBU_HUMAN	-	9,59	0,000
Single-stranded DNA-binding protein_ mitochondrial	SSBP_HUMAN	23,62	41,07	0,003
Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3	SMD3_HUMAN	16,61	-	0,000
Small nuclear ribonucleoprotein-associated proteins B and B'	RSMB_HUMAN	-	10,99	0,000
Sorbin and SH3 domain-containing protein 1	SRBS1_HUMAN	-	5,39	0,000
Splicing factor 1	SF01_HUMAN	4,97	9,30	0,016
Splicing factor 3A subunit 1	SF3A1_HUMAN	-	9,02	0,000
Splicing factor 3A subunit 2	SF3A2_HUMAN	-	17,34	0,000
Splicing factor 3B subunit 4	SF3B4_HUMAN	-	14,94	0,000
Splicing factor 3B subunit 6	SF3B6_HUMAN	7,58	14,53	0,049
Splicing factor 45	SPF45_HUMAN	-	5,23	0,000
Splicing factor U2AF 65 kDa subunit	U2AF2_HUMAN	26,60	32,95	0,008

Src substrate cortactin	SRC8_HUMAN	-	13,76	0,000
Stomatin-like protein 2_ mitochondrial	STML2_HUMAN	-	12,25	0,001
Stress-70 protein_ mitochondrial	GRP75_HUMAN	204,81	134,92	0,000
Stress-induced-phosphoprotein 1	STIP1_HUMAN	12,71	47,49	0,000
Succinyl-CoA:3-ketoacid coenzyme A transferase 1_ mitochondrial	SCOT1_HUMAN	-	6,82	0,000
Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog	VAT1_HUMAN	-	7,14	0,000
Syntaxin-7	STX7_HUMAN	18,79	12,60	0,004
TAR DNA-binding protein 43	TADBP_HUMAN	27,31	16,67	0,009
Thioredoxin domain-containing protein 12	TXD12_HUMAN	12,71	22,93	0,005
Thioredoxin_ mitochondrial	THIOM_HUMAN	-	25,77	0,000
Thioredoxin-dependent peroxide reductase_ mitochondrial	PRDX3_HUMAN	-	34,05	0,000
Trifunctional enzyme subunit beta_ mitochondrial	ECHB_HUMAN	-	6,78	0,000
Tropomyosin alpha-1 chain	TPM1_HUMAN	-	6,78	0,000
U2 small nuclear ribonucleoprotein A'	RU2A_HUMAN	-	4,87	0,000
Ubiquilin-1	UBQL1_HUMAN	11,46	7,83	0,021
UV excision repair protein RAD23 homolog B	RD23B_HUMAN	-	8,54	0,000
Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	VDAC2_HUMAN	43,70	21,53	0,000
V-type proton ATPase subunit F	VATF_HUMAN	-	7,17	0,000

Apêndice II. Lista de proteínas intracelulares de linhagem celular de melanoma B16F10, após o tratamento com peptídeos derivados de proteínas do soro de leite, produzidos por hidrólise com enzima microbiana secretada pelo fungo *M. thermophila*. O tratamento foi com solução de 4 µg/µL de peptídeos, as células foram coleta após 48 horas de exposição ao tratamento, o controle foi tratado nas mesmas condições apenas com água. . As proteínas identificadas em ao menos duas amostras da triplicata de cada grupo foram selecionadas para a análise estatística (test T), comparando com o tratamento. As proteínas que apresentaram valor de $p < 0,05$ estão apresentadas na tabela.

Proteína	Acesso	Controle (fmol)	Tratamento MG (fmol)	Valor de p
3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase_ mitochondrial	3HIDH_HUMAN	26,27	-	0,000
40S ribosomal protein S15a	RS15A_HUMAN	7,91	-	0,000
40S ribosomal protein S17-like	RS17L_HUMAN	29,06	15,77	0,004
40S ribosomal protein S19	RS19_HUMAN	9,76	-	0,000
40S ribosomal protein S27-like	RS27L_HUMAN	16,14	-	0,000
40S ribosomal protein S28	RS28_HUMAN	30,10	85,87	0,000
40S ribosomal protein S7	RS7_HUMAN	23,08	4,30	0,000
60S ribosomal protein L22	RL22_HUMAN	40,41	27,59	0,023
60S ribosomal protein L23	RL23_HUMAN	31,87	21,23	0,010
60S ribosomal protein L30	RL30_HUMAN	19,87	14,07	0,025
Aconitate hydratase_ mitochondrial	ACON_HUMAN	31,01	20,25	0,009
Actin_ aortic smooth muscle	ACTA_HUMAN	-	67,39	0,000
Actin_ cytoplasmic 1	ACTB_HUMAN	50,46	95,76	0,001
ADP/ATP translocase 1	ADT1_HUMAN	-	19,63	0,000
ADP/ATP translocase 2	ADT2_HUMAN	-	24,30	0,000
Aldehyde dehydrogenase_ mitochondrial	ALDH2_HUMAN	21,30	13,15	0,003
Alpha-2-HS-glycoprotein	FETUA_HUMAN	51,58	78,77	0,040
Aminoacyl tRNA synthase complex-interacting multifunctional protein 1	AIMP1_HUMAN	5,39	-	0,000
Aspartate aminotransferase_ mitochondrial	AATM_HUMAN	19,69	11,25	0,014
ATP synthase subunit alpha_ mitochondrial	ATPA_HUMAN	115,22	81,17	0,015
ATP synthase subunit beta_ mitochondrial	ATPB_HUMAN	97,34	44,95	0,000
ATP synthase subunit O_ mitochondrial	ATPO_HUMAN	81,18	36,94	0,000

ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit_ mitochondrial	CLPP_HUMAN	20,36	9,83	0,003
Barrier-to-autointegration factor	BAF_HUMAN	18,19	-	0,001
Bifunctional methylenetetrahydrofolate dehydrogenase/cyclohydrolase_ mitochondrial	MTDC_HUMAN	51,67	16,05	0,000
Calmodulin	CALM_HUMAN	42,94	160,40	0,000
Calponin-3	CNN3_HUMAN	6,46	-	0,000
Catalase	CATA_HUMAN	28,71	-	0,000
Charged multivesicular body protein 4b	CHM4B_HUMAN	-	10,28	0,000
Chromobox protein homolog 3	CBX3_HUMAN	11,98	-	0,000
Citrate synthase_ mitochondrial	CISY_HUMAN	25,52	39,19	0,009
Clathrin light chain A	CLCA_HUMAN	-	17,10	0,000
Clathrin light chain B	CLCB_HUMAN	15,53	27,73	0,004
Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 5	CPSF5_HUMAN	16,80	-	0,000
CUGBP Elav-like family member 2	CELF2_HUMAN	6,43	-	0,001
Cytochrome b5	CYB5_HUMAN	33,09	108,07	0,000
Cytochrome c oxidase subunit 5A_ mitochondrial	COX5A_HUMAN	86,85	35,87	0,000
Cytosolic acyl coenzyme A thioester hydrolase	BACH_HUMAN	21,59	-	0,013
Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex_ mitochondrial	ODP2_HUMAN	11,48	-	0,000
ELAV-like protein 1	ELAV1_HUMAN	67,82	42,44	0,005
Electron transfer flavoprotein subunit alpha_ mitochondrial	ETFA_HUMAN	101,82	58,21	0,004
Elongation factor Tu_ mitochondrial	EFTU_HUMAN	24,33	12,12	0,001
Endoplasmic reticulum resident protein 29	ERP29_HUMAN	-	17,01	0,000
Estradiol 17-beta-dehydrogenase 8	DHB8_HUMAN	8,68	-	0,001
Ezrin	EZRI_HUMAN	-	13,85	0,000
Far upstream element-binding protein 2	FUBP2_HUMAN	39,34	29,47	0,017
Far upstream element-binding protein 3	FUBP3_HUMAN	14,13	6,54	0,003
Fructose-bisphosphate aldolase A	ALDOA_HUMAN	35,24	21,90	0,001
Fumarate hydratase_ mitochondrial	FUMH_HUMAN	42,36	30,84	0,000
Galectin-1	LEG1_HUMAN	28,47	81,44	0,003

Heat shock-related 70 kDa protein 2	HSP72_HUMAN	3,82	-	0,033
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	ROAA_HUMAN	79,02	114,90	0,015
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0	ROA0_HUMAN	23,41	-	0,000
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	ROA3_HUMAN	248,32	204,10	0,003
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0	HNRPD_HUMAN	25,47	49,00	0,001
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like	HNRDL_HUMAN	10,25	14,03	0,023
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	HNRPF_HUMAN	19,39	-	0,000
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	HNRH1_HUMAN	112,17	77,03	0,026
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	HNRPL_HUMAN	59,72	33,11	0,001
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	HNRPM_HUMAN	105,52	38,86	0,000
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R	HNRPR_HUMAN	17,76	11,46	0,001
Histone H1.2	H12_HUMAN	76,20	51,70	0,033
Histone H2A type 1-A	H2A1A_HUMAN	17,03	-	0,000
Histone H2A.V	H2AV_HUMAN	43,97	23,90	0,002
Histone H2B type 1-B	H2B1B_HUMAN	4,37	-	0,000
Histone H2B type 1-C/E/F/G/I	H2B1C_HUMAN	149,67	235,57	0,008
Histone H3.2	H32_HUMAN	102,40	-	0,000
Histone H4	H4_HUMAN	96,81	68,03	0,008
Hypoxia up-regulated protein 1	HYOU1_HUMAN	17,31	13,23	0,004
Keratin_ type I cytoskeletal 10	K1C10_HUMAN	-	28,85	0,000
Keratin_ type I cytoskeletal 9	K1C9_HUMAN	-	24,06	0,000
Keratin_ type II cytoskeletal 1	K2C1_HUMAN	18,74	79,06	0,000
Keratin_ type II cytoskeletal 2 epidermal	K22E_HUMAN	-	17,36	0,000
Keratin_ type II cytoskeletal 5	K2C5_HUMAN	-	30,60	0,000
Keratin_ type II cytoskeletal 6B	K2C6B_HUMAN	-	15,90	0,000
LETM1 and EF-hand domain-containing protein 1_ mitochondrial	LETM1_HUMAN	21,12	11,87	0,003
Leucine-rich repeat-containing protein 59	LRC59_HUMAN	46,91	28,07	0,008
Melanocyte protein PMEL	PMEL_HUMAN	-	18,16	0,000
Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor	MANF_HUMAN	37,39	21,18	0,003

Methylglutaconyl-CoA hydratase_ mitochondrial	AUHM_HUMAN	13,89	-	0,000
Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim13	TIM13_HUMAN	22,95	13,51	0,015
Mitochondrial import receptor subunit TOM70	TOM70_HUMAN	8,44	-	0,002
Monofunctional C1-tetrahydrofolate synthase_ mitochondrial	C1TM_HUMAN	15,38	-	0,000
Myelin expression factor 2	MYEF2_HUMAN	20,25	9,54	0,005
Myosin light polypeptide 6	MYL6_HUMAN	45,84	35,98	0,021
NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2_ mitochondrial	NDUV2_HUMAN	7,34	-	0,001
NHP2-like protein 1	NH2L1_HUMAN	49,45	31,88	0,003
Non-POU domain-containing octamer-binding protein	NONO_HUMAN	65,20	23,27	0,000
Non-specific lipid-transfer protein	NLTP_HUMAN	-	37,11	0,000
Nucleophosmin	NPM_HUMAN	109,48	33,60	0,001
Nucleoporin NUP53	NUP53_HUMAN	7,90	-	0,000
Nucleoside diphosphate kinase B	NDKB_HUMAN	51,94	-	0,000
Paraspeckle component 1	PSPC1_HUMAN	12,46	-	0,000
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	PPIB_HUMAN	70,67	131,31	0,002
Peroxiredoxin-1 OS=Homo sapiens GN=PRDX1 PE=1 SV=1	PRDX1_HUMAN	29,64	88,13	0,000
Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein	PAIRB_HUMAN	-	20,26	0,000
Polyadenylate-binding protein 2	PABP2_HUMAN	16,62	-	0,000
Prohibitin	PHB_HUMAN	53,50	30,95	0,002
Prohibitin-2	PHB2_HUMAN	17,56	9,98	0,008
Protein disulfide-isomerase A4	PDIA4_HUMAN	22,45	45,30	0,014
Protein LYRIC	LYRIC_HUMAN	-	8,87	0,000
Putative nucleoside diphosphate kinase	NDK8_HUMAN	-	32,47	0,000
Putative RNA-binding protein 3	RBM3_HUMAN	27,13	-	0,000
Pyrroline-5-carboxylate reductase 1_ mitochondrial	P5CR1_HUMAN	15,33	-	0,000
Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta_ mitochondrial	ODPB_HUMAN	7,88	-	0,000
Pyruvate dehydrogenase protein X component_ mitochondrial	ODPX_HUMAN	12,66	-	0,000

Pyruvate kinase PKM	KPYM_HUMAN	19,84	12,99	0,020
Ras-related protein Rab-10	RAB10_HUMAN	-	9,60	0,000
RNA-binding motif protein_ X chromosome	RBMX_HUMAN	6,74	-	0,000
RNA-binding protein 14	RBM14_HUMAN	16,97	-	0,000
RNA-binding protein 39	RBM39_HUMAN	11,56	-	0,000
RNA-binding protein EWS	EWS_HUMAN	-	28,14	0,000
rRNA 2'-O-methyltransferase fibrillarin	FBRL_HUMAN	12,50	-	0,000
Serine/arginine-rich splicing factor 3	SRSF3_HUMAN	65,72	37,63	0,004
Serpin H1	SERPH_HUMAN	86,99	52,71	0,011
Serum albumin	ALBU_HUMAN	-	17,51	0,000
Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3	SMD3_HUMAN	16,61	-	0,000
SNW domain-containing protein 1	SNW1_HUMAN	10,94	-	0,000
Splicing factor 1	SF01_HUMAN	4,97	-	0,000
Splicing factor 3B subunit 2	SF3B2_HUMAN	20,73	-	0,000
Splicing factor 3B subunit 6	SF3B6_HUMAN	7,58	-	0,001
Splicing factor U2AF 65 kDa subunit	U2AF2_HUMAN	26,60	16,70	0,000
Splicing factor_ proline- and glutamine-rich	SFPQ_HUMAN	97,68	72,62	0,033
Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1	SND1_HUMAN	6,76	-	0,000
Stress-70 protein_ mitochondrial	GRP75_HUMAN	204,81	220,21	0,019
Stress-induced-phosphoprotein 1	STIP1_HUMAN	12,71	38,43	0,000
Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit_ mitochondrial	SDHB_HUMAN	18,11	-	0,000
Succinyl-CoA ligase [ADP/GDP-forming] subunit alpha_ mitochondrial	SUCA_HUMAN	58,01	-	0,000
Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog	VAT1_HUMAN	-	50,76	0,000
Synaptosomal-associated protein 23	SNP23_HUMAN	11,89	-	0,000
TAR DNA-binding protein 43	TADBP_HUMAN	27,31	-	0,000
Thioredoxin_ mitochondrial	THIOM_HUMAN	-	17,42	0,000
Trifunctional enzyme subunit alpha_ mitochondrial	ECHA_HUMAN	11,93	-	0,000
Ubiquilin-1	UBQL1_HUMAN	11,46	6,83	0,010

Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N	UBE2N_HUMAN	-	10,74	0,000
UPF0568 protein C14orf166	CN166_HUMAN	11,44	7,49	0,006
Vimentin	VIME_HUMAN	20,92	-	0,000
Vinculin	VINC_HUMAN	6,56	-	0,004
Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	VDAC1_HUMAN	82,88	55,35	0,021
Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	VDAC2_HUMAN	43,70	13,45	0,000
Voltage-dependent anion-selective channel protein 3	VDAC3_HUMAN	8,74	-	0,000
V-type proton ATPase subunit E 1	VATE1_HUMAN	50,82	23,99	0,002
V-type proton ATPase subunit F	VATF_HUMAN	-	6,69	0,000
V-type proton ATPase subunit G 1	VATG1_HUMAN	76,87	-	0,005

Apêndice III. Lista de proteínas intracelulares de linhagem celular Cal27 de tumores de camundongos Balb/c nude, após o tratamento com peptídeos derivados de proteínas do soro de leite, produzidos por hidrólise com enzima microbiana secretada pelo fungo *E. javanicum*. O tratamento foi com 10 µL de injeções intratumorais de solução 50 µg/µL de peptídeos a cada 72 horas durante 82 dias, o controle foi tratado nas mesmas condições apenas com solução salina. As proteínas identificadas em ao menos duas amostras da triplicata de cada grupo foram selecionadas para a análise estatística PLS-DA (*partial least squares discrimination*) comparando com o tratamento. As proteínas que apresentaram diferença estatística estão apresentadas na tabela.

Proteína	**Acesso**	**Controle (fmol)**	**Tratamento ES (fmol)**	**Componente 1**
182 kDa tankyrase-1-binding protein	TB182_HUMAN	16,12	-	2,25
2_4-dienoyl-CoA reductase_ mitochondrial	DECR_HUMAN	12,03	-	2,20
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 5	PSMD5_HUMAN	11,14	-	2,17
40S ribosomal protein S21	RS21_HUMAN	10,87	-	2,19
40S ribosomal protein S26	RS26_HUMAN	6,42	38,60	2,44
60S acidic ribosomal protein P0-like	RLA0L_HUMAN	3,85	-	1,94
Acetyl-CoA carboxylase 1	ACACA_HUMAN	27,12	-	1,72
Actin_ alpha skeletal muscle	ACTS_HUMAN	44,13	130,67	1,92
Actin_ aortic smooth muscle	ACTA_HUMAN	47,33	138,45	1,76
Actin_ gamma-enteric smooth muscle	ACTH_HUMAN	27,07	-	1,56
Actin-related protein 2/3 complex subunit 5	ARPC5_HUMAN	4,06	12,14	1,62
Acyl-protein thioesterase 2	LYPA2_HUMAN	2,60	8,28	1,56
Adenylosuccinate lyase	PUR8_HUMAN	-	33,91	2,84
Adenylosuccinate synthetase isozyme 2	PURA2_HUMAN	2,58	7,46	1,53
ADP/ATP translocase 1	ADT1_HUMAN	9,22	3,26	1,57
Alanine--tRNA ligase_ cytoplasmic	SYAC_HUMAN	3,70	29,98	1,73
Aldose reductase	ALDR_HUMAN	9,59	15,25	1,65
Alpha-soluble NSF attachment protein	SNAA_HUMAN	4,44	11,11	1,58
AP-2 complex subunit mu	AP2M1_HUMAN	29,46	-	2,33
ATP synthase subunit d_ mitochondrial	ATP5H_HUMAN	9,84	-	2,17
ATPase ASNA1	ASNA_HUMAN	2,89	11,17	1,58
Basal cell adhesion molecule	BCAM_HUMAN	-	6,13	2,02

B-cell receptor-associated protein 31	BAP31_HUMAN	6,80	13,90	1,63
Bifunctional lysine-specific demethylase and histidyl-hydroxylase NO66	NO66_HUMAN	88,03	-	1,85
BolA-like protein 2	BOLA2_HUMAN	15,31	-	2,26
Calcium-binding mitochondrial carrier protein SCaMC-2	SCMC2_HUMAN	42,91	57,05	1,82
Calreticulin	CALR_HUMAN	7,95	-	1,55
Caprin-1	CAPR1_HUMAN	5,32	12,55	2,22
Cell cycle and apoptosis regulator protein 2	CCAR2_HUMAN	7,58	-	1,55
Cellular retinoic acid-binding protein 2	RABP2_HUMAN	-	26,33	3,03
Ceruloplasmin	CERU_HUMAN	4,57	11,70	1,61
Collagen alpha-1(XIV) chain	COEA1_HUMAN	4,95	11,45	1,61
Cornifelin	CNFN_HUMAN	32,70	-	1,74
Cysteine and glycine-rich protein 2	CSRP2_HUMAN	7,87	-	1,55
Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske_ mitochondrial	UCRI_HUMAN	19,62	-	2,90
Cytochrome c oxidase subunit 6B1	CX6B1_HUMAN	13,40	-	2,22
Cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 2	DC1L2_HUMAN	0,99	3,31	1,89
Cytoplasmic FMR1-interacting protein 1	CYFP1_HUMAN	2,86	6,16	2,07
Cytoplasmic FMR1-interacting protein 2	CYFP2_HUMAN	0,47	4,88	1,94
D-dopachrome decarboxylase	DOPD_HUMAN	8,54	-	1,54
Delta(3_5)-Delta(2_4)-dienoyl-CoA isomerase_ mitochondrial	ECH1_HUMAN	9,59	-	2,15
Desmocollin-1	DSC1_HUMAN	3,95	6,12	1,51
Dihydropyrimidinase-related protein 3	DPYL3_HUMAN	0,97	6,16	2,06
Dipeptidyl peptidase 1	CATC_HUMAN	21,48	6,92	1,71
DNA damage-binding protein 1	DDB1_HUMAN	8,74	10,53	2,18
DNA replication licensing factor MCM3	MCM3_HUMAN	1,80	6,41	1,52
DNA-dependent protein kinase catalytic subunit	PRKDC_HUMAN	11,16	13,11	1,63
Dynamin-2	DYN2_HUMAN	4,03	9,86	2,17
Dynein light chain 2_ cytoplasmic	DYL2_HUMAN	2,84	6,62	1,53
Echinoderm microtubule-associated protein-like 2	EMAL2_HUMAN	9,59	-	2,11
Enoyl-CoA delta isomerase 1_ mitochondrial	ECI1_HUMAN	10,52	-	1,58

Enoyl-CoA hydratase_ mitochondrial	ECHM_HUMAN	16,86	5,44	1,69
Erlin-1	ERLN1_HUMAN	56,70	3,95	1,58
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit M	EIF3M_HUMAN	2,92	6,27	1,52
Farnesyl pyrophosphate synthase	FPPS_HUMAN	-	17,72	1,64
Ferritin light chain	FRIL_HUMAN	8,49	-	1,57
Galectin-3-binding protein	LG3BP_HUMAN	5,79	11,63	1,50
Gamma-glutamylcyclotransferase	GGCT_HUMAN	1,38	7,42	1,54
Glutathione peroxidase 3	GPX3_HUMAN	3,02	6,53	1,53
Glutathione S-transferase kappa 1	GSTK1_HUMAN	-	10,38	1,59
Glutathione synthetase	GSHB_HUMAN	10,11	-	2,17
Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)]_ cytoplasmic	GPDA_HUMAN	14,98	-	1,65
Glycogen phosphorylase_ muscle form	PYGM_HUMAN	-	7,64	2,06
GTPase KRas	RASK_HUMAN	6,44	-	1,52
Hemoglobin subunit delta	HBD_HUMAN	17,41	46,07	1,77
Hemoglobin subunit zeta	HBAZ_HUMAN	5,81	-	1,89
Hepatoma-derived growth factor	HDGF_HUMAN	6,01	14,47	2,25
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like	HNRDL_HUMAN	4,06	11,15	1,60
Histone H1.0	H10_HUMAN	-	11,95	1,62
Histone H1.1	H11_HUMAN	47,96	-	2,32
Histone H2A type 2-C	H2A2C_HUMAN	27,92	151,71	2,68
Histone H2B type 1-A	H2B1A_HUMAN	87,67	-	1,87
Histone H3.3	H33_HUMAN	122,10	-	1,91
Histone-binding protein RBBP4	RBBP4_HUMAN	0,80	10,44	2,77
HLA class I histocompatibility antigen_ A-1 alpha chain	1A01_HUMAN	2,59	-	1,84
HLA class I histocompatibility antigen_ B-7 alpha chain	1B07_HUMAN	-	9,42	2,05
Hsc70-interacting protein	F10A1_HUMAN	18,91	-	2,30
Ig kappa chain V-IV region Len	KV402_HUMAN	-	5,92	1,51
Insulin-degrading enzyme	IDE_HUMAN	1,99	7,36	1,54
Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2	IF2B2_HUMAN	3,56	7,36	2,51
Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit beta_ mitochondrial	IDH3B_HUMAN	6,00	-	1,51

Isocitrate dehydrogenase [NADP]_ mitochondrial	IDHP_HUMAN	11,04	19,88	1,55
Kallikrein-10	KLK10_HUMAN	4,06	6,88	1,54
Keratin_ type I cytoskeletal 12	K1C12_HUMAN	-	2,64	1,80
Keratin_ type I cytoskeletal 27	K1C27_HUMAN	0,89	6,56	2,02
Keratin_ type II cuticular Hb5	KRT85_HUMAN	-	11,63	1,56
Keratin_ type II cytoskeletal 1b	K2C1B_HUMAN	2,72	10,50	1,50
Keratin_ type II cytoskeletal 2 oral	K22O_HUMAN	1,88	11,81	1,51
Keratin-like protein KRT222	KT222_HUMAN	1,55	5,62	1,66
Lamina-associated polypeptide 2_ isoform alpha	LAP2A_HUMAN	13,34	-	2,00
Large neutral amino acids transporter small subunit 1	LAT1_HUMAN	3,81	6,59	1,52
Leucine-rich repeat-containing protein 47	LRC47_HUMAN	5,10	-	2,02
Leucine-rich repeat-containing protein 59	LRC59_HUMAN	11,28	20,13	1,55
Long-chain fatty acid transport protein 1	S27A1_HUMAN	17,27	-	1,67
Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 1	ACSL1_HUMAN	21,11	-	1,69
Low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase	PPAC_HUMAN	3,81	13,02	2,22
Lymphocyte antigen 6D	LY6D_HUMAN	11,78	-	1,60
Lysine--tRNA ligase	SYK_HUMAN	13,55	21,84	1,65
Matrin-3	MATR3_HUMAN	19,35	-	2,30
Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor	MANF_HUMAN	5,49	14,55	1,64
Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [acylating]_ mitochondrial	MMSA_HUMAN	19,22	5,29	1,71
MICOS complex subunit MIC19	MIC19_HUMAN	7,71	-	1,54
Mitochondrial-processing peptidase subunit beta	MPPB_HUMAN	4,55	-	1,97
Mitotic checkpoint protein BUB3	BUB3_HUMAN	3,21	5,72	1,50
Myosin light chain 1/3_ skeletal muscle isoform	MYL1_HUMAN	4,84	15,00	2,25
Myosin light chain 6B	MYL6B_HUMAN	0,64	2,08	1,73
Myosin regulatory light chain 2_ skeletal muscle isoform	MLRS_HUMAN	-	8,24	1,53
Myosin regulatory light polypeptide 9	MYL9_HUMAN	7,46	-	1,55
Myosin-1	MYH1_HUMAN	14,58	49,44	1,87
Myosin-3	MYH3_HUMAN	5,98	19,79	1,55

Myosin-4	MYH4_HUMAN	4,08	36,56	1,86
Myosin-7	MYH7_HUMAN	17,23	34,80	1,59
Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1	NHRF1_HUMAN	6,64	-	2,06
NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 2_ mitochondrial	NDUS2_HUMAN	8,71	-	1,57
NADP-dependent malic enzyme	MAOX_HUMAN	9,81	-	1,56
NHP2-like protein 1	NH2L1_HUMAN	12,58	-	1,62
Omega-amidase NIT2	NIT2_HUMAN	8,19	15,45	1,53
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	FKB1A_HUMAN	14,00	-	1,60
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP2	FKBP2_HUMAN	-	10,46	1,59
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase-like 1	PPIL1_HUMAN	2,78	7,69	1,54
Perilipin-3	PLIN3_HUMAN	6,78	-	1,53
Peripherin	PERI_HUMAN	3,75	-	2,08
Phenylalanine--tRNA ligase beta subunit	SYFB_HUMAN	7,40	-	1,53
Phosphoglycerate kinase 2	PGK2_HUMAN	2,71	-	1,87
Phosphoglycerate mutase 2	PGAM2_HUMAN	5,48	11,77	1,56
Poly [ADP-ribose] polymerase 1	PARP1_HUMAN	8,80	-	2,15
Polymerase I and transcript release factor	PTRF_HUMAN	36,18	13,90	1,73
Polypyrimidine tract-binding protein 1	PTBP1_HUMAN	28,82	9,67	1,76
POTE ankyrin domain family member J	POTEJ_HUMAN	43,43	50,28	1,54
Pre-mRNA-processing-splicing factor 8	PRP8_HUMAN	-	27,05	1,62
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX6	DDX6_HUMAN	-	13,55	2,83
Protein FAM83H	FA83H_HUMAN	5,98	-	1,52
Protein LYRIC	LYRIC_HUMAN	-	8,08	2,12
Protein mago nashi homolog	MGN_HUMAN	7,83	25,02	1,65
Protein NipSnap homolog 2	NIPS2_HUMAN	2,80	5,76	1,51
Protein PML	PML_HUMAN	5,38	17,05	2,27
Protein RCC2	RCC2_HUMAN	13,61	6,52	1,53
Protein transport protein Sec61 subunit alpha isoform 1	S61A1_HUMAN	2,47	11,67	2,20
Putative 40S ribosomal protein S26-like 1	RS26L_HUMAN	31,76	-	2,40

Putative heat shock protein HSP 90-alpha A5	HS905_HUMAN	2,90	0,26	1,53
Putative heat shock protein HSP 90-beta 4	H90B4_HUMAN	0,10	5,28	2,21
Ras-related protein Rab-11A	RB11A_HUMAN	-	31,37	2,40
Ras-related protein Rab-11B	RB11B_HUMAN	43,66	7,21	3,14
Ras-related protein Rab-12	RAB12_HUMAN	12,54	-	1,62
Ras-related protein Rab-15	RAB15_HUMAN	2,05	1,72	1,70
Ras-related protein Rab-1B	RAB1B_HUMAN	29,00	13,07	1,65
Ras-related protein Rab-4A	RAB4A_HUMAN	21,86	-	2,12
Ras-related protein Rab-5A	RAB5A_HUMAN	22,53	-	1,56
Ras-related protein Rab-5B	RAB5B_HUMAN	0,21	6,90	1,53
Ras-related protein Rab-6B	RAB6B_HUMAN	-	15,99	2,22
Ras-related protein Ral-A	RALA_HUMAN	10,32	-	2,17
Retinal dehydrogenase 1	AL1A1_HUMAN	14,61	5,91	1,59
Ribosomal protein S6 kinase alpha-2	KS6A2_HUMAN	14,91	-	1,64
RNA-binding protein EWS	EWS_HUMAN	-	8,06	1,56
RNA-binding protein Raly	RALY_HUMAN	8,95	-	1,56
Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1	AT2A1_HUMAN	2,78	50,98	1,93
Serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit alpha isoform	PP2BA_HUMAN	10,00	-	1,53
Sideroflexin-3	SFXN3_HUMAN	13,31	2,47	2,81
Signal peptidase complex subunit 2	SPCS2_HUMAN	4,57	11,16	1,60
Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1	SMD1_HUMAN	-	15,93	1,63
Spermatogenesis-associated protein 5	SPAT5_HUMAN	-	6,23	2,00
Spermine synthase	SPSY_HUMAN	8,55	-	2,70
Splicing factor 3A subunit 3	SF3A3_HUMAN	6,58	-	2,02
Splicing factor 3B subunit 6	SF3B6_HUMAN	2,05	7,42	2,11
Succinyl-CoA ligase [GDP-forming] subunit beta_ mitochondrial	SUCB2_HUMAN	10,93	-	1,59
SUMO-conjugating enzyme UBC9	UBC9_HUMAN	5,72	-	1,50
Surfeit locus protein 4	SURF4_HUMAN	7,33	-	1,53

Synaptonemal complex central element protein 1	SYCE1_HUMAN	6,91	13,99	2,24
TAR DNA-binding protein 43	TADBP_HUMAN	13,27	5,04	1,61
T-complex protein 1 subunit zeta-2	TCPW_HUMAN	-	7,39	2,68
Testin	TES_HUMAN	5,64	1,87	1,50
THO complex subunit 4	THOC4_HUMAN	21,06	-	2,31
Thrombospondin-2	TSP2_HUMAN	6,55	7,74	1,55
Transcription elongation factor B polypeptide 1	ELOC_HUMAN	4,19	10,57	2,18
Transcriptional activator protein Pur-beta	PURB_HUMAN	14,79	-	2,22
Transmembrane emp24 domain-containing protein 10	TMEDA_HUMAN	12,72	26,29	1,64
Transmembrane protein 109	TM109_HUMAN	-	5,50	1,50
Trifunctional purine biosynthetic protein adenosine-3	PUR2_HUMAN	5,57	-	1,50
Tropomyosin alpha-4 chain	TPM4_HUMAN	13,56	4,92	1,58
Tropomyosin beta chain	TPM2_HUMAN	3,79	12,36	1,66
Tubulin alpha-1A chain	TBA1A_HUMAN	91,84	359,67	1,64
Tubulin alpha-1B chain	TBA1B_HUMAN	276,92	-	2,78
Tubulin beta-1 chain	TBB1_HUMAN	0,44	6,01	2,30
Tubulin beta-2B chain	TBB2B_HUMAN	-	35,69	1,60
Twinfilin-1	TWF1_HUMAN	2,55	6,22	1,52
Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 6	PTN6_HUMAN	3,71	6,62	1,53
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L3	UCHL3_HUMAN	10,77	-	2,18
Vacuolar protein sorting-associated protein 26A	VP26A_HUMAN	7,14	-	2,09
Vacuolar protein sorting-associated protein 4A	VPS4A_HUMAN	47,01	-	1,80
Vacuolar protein sorting-associated protein 4B	VPS4B_HUMAN	12,17	-	2,82
Vesicle-associated membrane protein-associated protein B/C	VAPB_HUMAN	7,68	-	2,66
Vesicular integral-membrane protein VIP36	LMAN2_HUMAN	6,24	-	1,52
V-type proton ATPase subunit D	VATD_HUMAN	2,83	6,59	1,53
V-type proton ATPase subunit E 1	VATE1_HUMAN	5,73	12,34	1,62
Xaa-Pro aminopeptidase 1	XPP1_HUMAN	5,56	-	1,50
Zinc finger protein 185	ZN185_HUMAN	7,67	-	1,55

Apêndice IV. Lista de proteínas intracelulares de linhagem celular Cal27 de tumores de camundongos Balb/c nude, após o tratamento com peptídeos derivados de proteínas do soro de leite, produzidos por hidrólise com enzima microbiana secretada pelo fungo *M. thermophila*. O tratamento foi com 10 µL de injeções intratumorais de solução 50 µg/µL de peptídeos a cada 72 horas durante 82 dias, o controle foi tratado nas mesmas condições apenas com solução salina. . As proteínas identificadas em ao menos duas amostras da triplicata de cada grupo foram selecionadas para a análise estatística PLS-DA (*partial least squares discrimination*) comparando com o tratamento. As proteínas que apresentaram diferença estatística estão apresentadas na tabela.

Proteína	**Acesso**	**Controle (fmol)**	**Tratamento MS (fmol)**	Componente 1
40S ribosomal protein S21	RS21_HUMAN	10,87	-	1,78
40S ribosomal protein S27-like	RS27L_HUMAN	45,97	-	2,59
60S acidic ribosomal protein P0-like	RLA0L_HUMAN	3,85	-	1,57
60S ribosomal protein L17	RL17_HUMAN	21,58	-	2,42
Acetyl-CoA acetyltransferase_ cytosolic	THIC_HUMAN	13,82	-	1,81
Actin_ alpha skeletal muscle	ACTS_HUMAN	44,13	279,45	2,11
Actin-related protein 2/3 complex subunit 5	ARPC5_HUMAN	4,06	26,14	2,48
Acyl-protein thioesterase 2	LYPA2_HUMAN	2,60	12,52	1,69
Adenylosuccinate synthetase isozyme 2	PURA2_HUMAN	2,58	7,31	2,21
Adipocyte plasma membrane-associated protein	APMAP_HUMAN	15,68	-	1,81
ADP-ribosylation factor 6	ARF6_HUMAN	10,76	-	1,76
ADP-ribosylation factor-like protein 8B	ARL8B_HUMAN	4,04	7,68	1,61
Alanine--tRNA ligase_ cytoplasmic	SYAC_HUMAN	3,70	8,22	1,63
Aldose reductase	ALDR_HUMAN	9,59	30,26	1,80
Alpha-2-macroglobulin-like protein 1	A2ML1_HUMAN	31,41	-	2,52
Anterior gradient protein 2 homolog	AGR2_HUMAN	9,84	10,64	1,66
AP-1 complex subunit mu-1	AP1M1_HUMAN	3,29	13,05	1,67
Apoptosis-inducing factor 1_ mitochondrial	AIFM1_HUMAN	3,41	4,82	1,54
ATP synthase subunit g_ mitochondrial	ATP5L_HUMAN	9,65	-	1,76
ATP synthase subunit gamma_ mitochondrial	ATPG_HUMAN	24,12	-	2,48
ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit_ mitochondrial	CLPP_HUMAN	2,46	4,54	1,53

ATP-dependent RNA helicase DDX3Y	DDX3Y_HUMAN	10,58	-	1,68
Basic leucine zipper and W2 domain-containing protein 1	BZW1_HUMAN	1,86	10,14	2,29
Basic leucine zipper and W2 domain-containing protein 2	BZW2_HUMAN	2,95	5,83	1,57
Basigin	BASI_HUMAN	7,56	-	1,67
B-cell receptor-associated protein 31	BAP31_HUMAN	6,80	16,39	1,73
Beta-centractin	ACTY_HUMAN	-	5,16	1,54
Biliverdin reductase A	BIEA_HUMAN	12,86	-	1,80
BolA-like protein 2	BOLA2_HUMAN	15,31	-	1,83
Brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2	BAIP2_HUMAN	13,81	5,22	1,55
Caprin-1	CAPR1_HUMAN	5,32	14,00	1,70
Carbonic anhydrase 2	CAH2_HUMAN	9,10	11,23	2,30
Cellular retinoic acid-binding protein 2	RABP2_HUMAN	-	12,87	1,69
Ceruloplasmin	CERU_HUMAN	4,57	17,57	1,74
Chromatin target of PRMT1 protein	CHTOP_HUMAN	2,48	6,58	1,58
Chromobox protein homolog 3	CBX3_HUMAN	-	6,69	1,59
Chymase	CMA1_HUMAN	2,32	15,95	1,66
Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 6	CPSF6_HUMAN	-	6,88	1,60
Collagen alpha-1(XIV) chain	COEA1_HUMAN	4,95	39,98	1,86
Complement component 1 Q subcomponent-binding protein_ mitochondrial	C1QBP_HUMAN	10,43	-	1,75
Complement factor B	CFAB_HUMAN	-	4,88	1,53
COP9 signalosome complex subunit 4	CSN4_HUMAN	-	6,44	1,59
Copine-1	CPNE1_HUMAN	15,26	-	1,83
Core histone macro-H2A.2	H2AW_HUMAN	0,43	31,44	2,14
Creatine kinase M-type	KCRM_HUMAN	-	17,25	1,72
Creatine kinase S-type_ mitochondrial	KCRS_HUMAN	12,39	90,71	1,96
Cystatin-B	CYTB_HUMAN	21,05	-	1,85
Cysteine-rich protein 2	CRIP2_HUMAN	15,77	-	1,81
Cytochrome b-245 heavy chain	CY24B_HUMAN	2,67	9,97	1,65
Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske_ mitochondrial	UCRI_HUMAN	19,62	-	2,39

Cytochrome c oxidase subunit 6B1	CX6B1_HUMAN	13,40	-	1,80
Cytoplasmic FMR1-interacting protein 1	CYFP1_HUMAN	2,86	14,41	2,37
Cytosolic acyl coenzyme A thioester hydrolase	BACH_HUMAN	4,23	10,95	1,67
Delta(3_5)-Delta(2_4)-dienoyl-CoA isomerase_ mitochondrial	ECH1_HUMAN	9,59	-	1,74
Dihydropyrimidinase-related protein 1	DPYL1_HUMAN	0,71	4,08	1,93
Dihydropyrimidinase-related protein 3	DPYL3_HUMAN	0,97	18,14	2,38
DNA damage-binding protein 1	DDB1_HUMAN	8,74	12,28	2,33
DNA-dependent protein kinase catalytic subunit	PRKDC_HUMAN	11,16	11,37	1,68
Dynamin-2	DYN2_HUMAN	4,03	17,59	2,41
Echinoderm microtubule-associated protein-like 2	EMAL2_HUMAN	9,59	-	1,72
Erlin-1	ERLN1_HUMAN	56,70	0,82	1,72
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L	EIF3L_HUMAN	2,71	12,70	2,34
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit M	EIF3M_HUMAN	2,92	7,13	1,60
Eukaryotic translation initiation factor 4E	IF4E_HUMAN	2,50	7,39	1,59
Eukaryotic translation initiation factor 4H	IF4H_HUMAN	11,81	-	1,79
Exportin-1	XPO1_HUMAN	3,06	8,60	1,63
Far upstream element-binding protein 2	FUBP2_HUMAN	2,82	5,56	1,56
Fermitin family homolog 3	URP2_HUMAN	4,15	9,18	1,64
Filamin-C	FLNC_HUMAN	4,22	17,28	1,73
Gamma-glutamylcyclotransferase	GGCT_HUMAN	1,38	6,08	1,55
Glucosamine-6-phosphate isomerase 1	GNPI1_HUMAN	-	13,45	2,29
Glutathione S-transferase kappa 1	GSTK1_HUMAN	-	13,49	1,70
Glutathione S-transferase Mu 2	GSTM2_HUMAN	13,41	-	2,35
Glutathione S-transferase Mu 3	GSTM3_HUMAN	15,11	-	2,36
Glycine amidinotransferase_ mitochondrial	GATM_HUMAN	4,23	11,49	1,68
Glycogen phosphorylase_ muscle form	PYGM_HUMAN	-	39,27	2,44
GTP:AMP phosphotransferase AK3_ mitochondrial	KAD3_HUMAN	-	4,69	1,53
Guanine deaminase	GUAD_HUMAN	14,99	-	1,81
Guanine nucleotide-binding protein G(t) subunit alpha-1	GNAT1_HUMAN	3,82	-	1,96
Heat shock 70 kDa protein 6	HSP76_HUMAN	9,35	0,67	1,66

Hemoglobin subunit zeta	HBAZ_HUMAN	5,81	-	1,53
Hepatoma-derived growth factor	HDGF_HUMAN	6,01	19,20	1,76
Histone H1.0	H10_HUMAN	-	19,07	1,76
Histone H1.1	H11_HUMAN	47,96	-	1,88
Histone H2B type 1-A	H2B1A_HUMAN	87,67	-	1,51
Histone H3.1	H31_HUMAN	154,73	-	2,17
Histone-binding protein RBBP4	RBBP4_HUMAN	0,80	10,67	2,27
Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase_ cytoplasmic	HMCS1_HUMAN	18,47	-	1,73
Hypoxia up-regulated protein 1	HYOU1_HUMAN	-	11,76	1,68
Ig kappa chain V-II region Cum	KV201_HUMAN	-	38,88	1,81
Insulin-degrading enzyme	IDE_HUMAN	1,99	17,30	1,73
Integrin-linked protein kinase	ILK_HUMAN	2,79	9,14	1,63
Interferon-induced GTP-binding protein Mx1	MX1_HUMAN	1,46	12,60	1,70
Keratin_ type I cuticular Ha3-II	KT33B_HUMAN	-	1,59	1,69
Keratin_ type I cuticular Ha7	KRT37_HUMAN	0,47	7,83	1,62
Keratin_ type I cytoskeletal 12	K1C12_HUMAN	-	2,74	1,71
Keratin_ type I cytoskeletal 27	K1C27_HUMAN	0,89	15,00	1,70
Keratin_ type II cytoskeletal 71	K2C71_HUMAN	7,24	-	1,70
Kinesin-1 heavy chain	KINH_HUMAN	17,98	-	1,75
Lactotransferrin	TRFL_HUMAN	1,28	6,77	1,50
Legumain	LGMN_HUMAN	-	16,17	1,73
Leucine-rich repeat-containing protein 47	LRC47_HUMAN	5,10	-	1,64
Lysine--tRNA ligase	SYK_HUMAN	13,55	32,71	2,40
Mast cell carboxypeptidase A	CBPA3_HUMAN	-	42,06	1,81
Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor	MANF_HUMAN	5,49	8,01	1,62
Methylosome subunit pICln	ICLN_HUMAN	-	6,42	1,56
Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein	M2OM_HUMAN	7,73	-	1,72
Mitochondrial carrier homolog 2	MTCH2_HUMAN	2,80	7,78	1,58
Mitochondrial-processing peptidase subunit beta	MPPB_HUMAN	4,55	-	1,60
Mitotic checkpoint protein BUB3	BUB3_HUMAN	3,21	4,34	1,50

mRNA turnover protein 4 homolog	MRT4_HUMAN	-	18,52	1,73
Myosin light chain 1/3_ skeletal muscle isoform	MYL1_HUMAN	4,84	20,85	1,77
Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1	NHRF1_HUMAN	6,64	-	1,67
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 10	NDUBA_HUMAN	-	7,74	1,60
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 4	NDUB4_HUMAN	-	4,54	1,53
NEDD8-conjugating enzyme Ubc12	UBC12_HUMAN	9,07	-	1,74
Neurofilament light polypeptide	NFL_HUMAN	0,41	9,93	1,56
NSFL1 cofactor p47	NSF1C_HUMAN	-	8,33	1,63
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP2	FKBP2_HUMAN	-	13,56	1,70
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP4	FKBP4_HUMAN	4,94	30,00	1,72
Phosphatidylinositol-binding clathrin assembly protein	PICAL_HUMAN	3,59	18,48	2,35
Phosphoglycerate kinase 2	PGK2_HUMAN	2,71	-	1,51
Phospholipase B-like 1	PLBL1_HUMAN	3,38	11,54	1,65
Platelet-derived growth factor receptor alpha	PGFRA_HUMAN	72,62	-	1,81
POTE ankyrin domain family member F	POTEF_HUMAN	87,19	76,13	1,65
Programmed cell death protein 6	PDCD6_HUMAN	-	7,19	1,61
Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-2	P4HA2_HUMAN	5,70	-	1,67
Proteasome subunit beta type-5	PSB5_HUMAN	2,59	4,88	1,53
Proteasome subunit beta type-6	PSB6_HUMAN	11,89	-	2,28
Proteasome subunit beta type-7	PSB7_HUMAN	3,60	14,93	1,67
Proteasome subunit beta type-8	PSB8_HUMAN	1,67	5,70	1,57
Protein phosphatase 1 regulatory subunit 7	PP1R7_HUMAN	10,07	-	1,75
Protein POF1B	POF1B_HUMAN	4,79	10,42	1,66
Protein RCC2	RCC2_HUMAN	13,61	-	2,34
Protein S100-A16	S10AG_HUMAN	17,49	-	2,40
Protein transport protein Sec61 subunit alpha isoform 1	S61A1_HUMAN	2,47	17,93	2,39
Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2	TGM2_HUMAN	4,93	10,49	1,67
Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase K	TGM1_HUMAN	9,92	-	1,73

Protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferase	PIMT_HUMAN	-	5,87	1,57
Putative heat shock protein HSP 90-alpha A2	HS902_HUMAN	10,70	-	1,59
Putative heat shock protein HSP 90-alpha A5	HS905_HUMAN	2,90	-	1,68
Putative nucleoside diphosphate kinase	NDK8_HUMAN	-	18,63	1,75
Putative RNA-binding protein Luc7-like 2	LC7L2_HUMAN	1,87	5,34	1,56
Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha_ somatic form_ mitochondrial	ODPA_HUMAN	4,98	6,00	1,57
Ras-related protein Rab-15	RAB15_HUMAN	2,05	11,13	1,89
Ras-related protein Rab-21	RAB21_HUMAN	-	6,48	1,59
Ras-related protein Rab-43	RAB43_HUMAN	0,24	3,77	2,02
Ras-related protein Rab-4A	RAB4A_HUMAN	21,86	-	1,72
Ras-related protein Rab-6A	RAB6A_HUMAN	17,84	-	1,80
Retinol-binding protein 1	RET1_HUMAN	-	12,84	2,33
S-adenosylmethionine synthase isoform type-2	METK2_HUMAN	2,89	9,09	1,64
Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 3	AT2A3_HUMAN	0,89	4,37	1,96
Serine/arginine-rich splicing factor 9	SRSF9_HUMAN	2,56	4,17	1,51
Serine/threonine-protein kinase 24	STK24_HUMAN	-	6,10	1,58
Serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit	PP1G_HUMAN	-	7,22	2,20
Serpin B13	SPB13_HUMAN	30,80	-	2,51
Serpin B6	SPB6_HUMAN	1,84	11,38	1,67
S-formylglutathione hydrolase	ESTD_HUMAN	25,78	-	2,49
SH3 domain-binding protein 1	3BP1_HUMAN	-	17,57	2,32
Signal peptidase complex subunit 2	SPCS2_HUMAN	4,57	22,82	1,77
Signal recognition particle 54 kDa protein	SRP54_HUMAN	-	4,54	1,53
Small nuclear ribonucleoprotein Sm D2	SMD2_HUMAN	6,30	10,32	1,66
Sorcin	SORCN_HUMAN	-	7,58	1,61
Sorting nexin-1	SNX1_HUMAN	2,66	6,13	1,58
Spermine synthase	SPSY_HUMAN	8,55	-	2,23
Splicing factor 3A subunit 3	SF3A3_HUMAN	6,58	-	1,64

Splicing factor 3B subunit 6	SF3B6_HUMAN	2,05	9,12	2,26
Spondin-1	SPON1_HUMAN	3,37	17,77	2,38
Src substrate cortactin	SRC8_HUMAN	14,98	-	2,36
Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta_ mitochondrial	SUCB1_HUMAN	9,39	-	1,75
Thiosulfate sulfurtransferase	THTR_HUMAN	8,14	-	1,70
THO complex subunit 4	THOC4_HUMAN	21,06	-	1,87
Thrombospondin-1	TSP1_HUMAN	17,34	-	1,85
Thrombospondin-2	TSP2_HUMAN	6,55	4,89	1,54
Transcription elongation factor B polypeptide 1	ELOC_HUMAN	4,19	11,72	2,32
Transcription intermediary factor 1-beta	TIF1B_HUMAN	3,90	5,44	1,56
Transcriptional activator protein Pur-beta	PURB_HUMAN	14,79	-	1,80
Tubulin alpha chain-like 3	TBAL3_HUMAN	6,24	-	1,57
Tubulin alpha-1B chain	TBA1B_HUMAN	276,92	-	2,26
Tubulin beta-1 chain	TBB1_HUMAN	0,44	2,09	1,80
Twinfilin-1	TWF1_HUMAN	2,55	5,49	1,56
Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 6	PTN6_HUMAN	3,71	11,80	1,68
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1	UB2V1_HUMAN	3,98	7,85	1,62
UPF0160 protein MYG1_ mitochondrial	MYG1_HUMAN	7,84	-	2,22
Vascular endothelial growth factor receptor 3	VGFR3_HUMAN	5,76	-	1,58
Vasodilator-stimulated phosphoprotein	VASP_HUMAN	14,30	-	1,82
V-type proton ATPase subunit d 1	VA0D1_HUMAN	2,51	11,30	2,31
V-type proton ATPase subunit D	VATD_HUMAN	2,83	9,84	1,65
V-type proton ATPase subunit E 1	VATE1_HUMAN	5,73	26,46	2,50
V-type proton ATPase subunit G 1	VATG1_HUMAN	8,99	-	2,24