



XXII CONGRESSO
BRASILEIRO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
23 a 26 de Setembro de 2018
Hotel Maksoud Plaza
São Paulo – SP



XVII ENCONTRO BRASILEIRO
SOBRE O ENSINO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
27 a 28 de Setembro de 2018
USP
São Paulo – SP

APLICAÇÃO DE DIFERENTES PRÉ-TRATAMENTOS AO PLASMA DE SANGUE BOVINO PREVIAMENTE À HIDRÓLISE EMPREGANDO PROTEASE DE *Bacillus* sp. P45

PRESTES CF.¹, MACHADO TB.¹, BORBA TM.¹, BRANDELLI A², KALIL SJ.¹

¹ Universidade Federal do Rio Grande, Escola de Química e Alimentos

² Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos

E-mail para contato: carolinepresteseng@hotmail.com

RESUMO – A hidrólise enzimática é considerada um método atrativo em estudos biotecnológicos, e tem sido utilizada na obtenção de peptídeos. Logo, este estudo teve como propósito a avaliação do efeito do pré-tratamento térmico do plasma de sangue bovino como substrato da hidrólise enzimática catalisada por protease P45 tendo como resposta o grau de hidrólise (GH). Previamente à reação enzimática, o substrato foi submetido aos pré-tratamentos nas temperaturas de 50°C, 70°C, 90°C e banho ultrassônico a 50°C, sendo o GH estimado através do método pH-stat. Os GH para os pré-tratamentos a 50°C e 70°C não diferiram estatisticamente. O pré tratamento a 50°C foi o escolhido para prosseguir as análises de trabalhos futuros.

1. INTRODUÇÃO

O sangue é um subproduto gerado em elevada quantidade pela indústria de carnes. Suas frações são divididas em duas porções - a fração celular e o plasma - sendo este segundo o composto majoritário. Há problemas quando descartado incorretamente, uma vez que além de ser produzido em elevadas quantidades e não ter 100% de aproveitamento para outros fins, o sangue possui alta carga poluente (BAH et al., 2013), necessitando de vias alternativas para o uso, como a obtenção de peptídios. Na sua forma nativa, o plasma não se encontra em condições propícias para a atuação de proteases, e, devido a isso, torna-se necessário o emprego de pré-tratamento, uma vez que ocorre o rearranjo da cadeia proteica (BAH et al., 2016; WANASUNDARA et al., 2002).

A hidrólise enzimática é um método atrativo em estudos biotecnológicos, e é a principal via para obtenção de peptídeos frente aos métodos de hidrólise química e física (HIDALGO et al., 2012). A reação possui características e peculiaridades como o curto período de tempo para realizar a hidrólise, além da atividade enzimática ser obtida em condições controladas, tornando as enzimas proteolíticas uma vantagem com relação a outros métodos usuais na obtenção de peptídeos bioativos (HIDALGO et al., 2012). Tais peptídeos resultantes, provenientes de distintas fontes proteicas, podem carrear propriedades como atividade antioxidante, antimicrobiana, opióide, imunomodulador e atividade antitrombótica (TRUSEK-HOLOWNIA; LECH; NOWORYTA, 2016).



XXII CONGRESSO
BRASILEIRO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
23 a 26 de Setembro de 2018
Hotel Maksoud Plaza
São Paulo – SP



XVII ENCONTRO BRASILEIRO
SOBRE O ENSINO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
27 a 28 de Setembro de 2018
USP
São Paulo – SP

Dentre os possíveis métodos a serem empregados para avaliar a hidrólise através do grau de hidrólise (GH), o método pH-*stat* é o mais usual e simples. O princípio da técnica é que, quando a hidrólise é realizada em condições neutras ou alcalinas, a dissociação de prótons dos grupos amino livres liberados é favorecida. A liberação de prótons no meio circundante leva a uma redução no pH da mistura de reação. O número de ligações peptídicas clivadas pode ser estimado a partir da quantidade de base necessária para manter um pH constante durante a reação (ADLER-NISSEN, 1986).

Com base no exposto acima, este estudo tem por objetivo avaliar o efeito do pré-tratamento térmico do plasma de sangue bovino como substrato da hidrólise enzimática catalisada por protease P45 tendo como resposta o grau de hidrólise.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Para a produção da protease, a partir de cultivo submerso, foi utilizado a bactéria *Bacillus* sp. P45. A enzima foi purificada através de sistema aquoso bifásico integrado ao processo de diafiltração (SALA et al., 2014). A reação foi iniciada pela adição de 2 mL do extrato enzimático, previamente hidratado em tampão Tris- HCl 100 mmol/L pH 7,5 e adicionado de CaCl₂ 50 mmol/L. O substrato proteico plasma, oriundo do sangue coletado de um abatedouro bovino da cidade de Pelotas/RS (GONÇALVES, 2016) foi submetido aos pré tratamentos: aquecimento em banho maria a 50, 70 e 90°C por 20 min e aquecimento em banho ultrassônico a 50°C durante 2 ciclos de 480 s (WANASUNDARA et al., 2002; DALAGNOL et al, 2017). As reações de hidrólise do plasma foram realizadas em duplicata em reatores encamisados de 100 mL, o GH foi estimado pelo método de pH-*stat* a partir do monitoramento dos valores de pH da reação (ADLER-NISSEN, 1986). As condições da reação foram 40°C, tempo de 8 h, pH 7,5, concentração de substrato de 2,5% e relação enzima:substrato 600 U/(g de prot.) (GONÇALVES, 2016). Durante o processo foram realizadas titulações em tempos pré-determinados com hidróxido de sódio 0,2 mol/L com o propósito de manter o pH constante. Os dados de pH obtidos foram registrados na interface computacional Arduino Uno® e o GH foi determinado pela combinação da Equação 1, da Equação 2 e Equação 3. Ao término, os hidrolisados foram aquecidos a 100°C durante 10 min e, então armazenados sob congelamento. Os dados foram estatisticamente avaliados por ANOVA seguido por diferença de médias (Tukey) em um nível de confiança de 95%.

$$\text{GH}(\%) = \frac{BN_B}{\alpha h_{\text{tot}} m_p} \quad (1) \quad \alpha = \frac{10^{(\text{pH}-\text{pK})}}{1+10^{(\text{pH}-\text{pK})}} \quad (2) \quad \text{pK} = 7,8 + \frac{298-T}{2400} \quad (3)$$

Onde: B é o volume consumido de base durante a hidrólise (mL); N_B é a normalidade da base consumida durante a hidrólise; m_p é a massa de proteína do substrato proteico (g); h_{tot} é o número de ligações peptídicas (mol/kg); α é o grau de grupamentos amino liberados pela hidrólise; pH é o valor fixado para o método de pH-*stat*; pK é a constante de dissociação ácida do grupamento amino; e T é a temperatura da hidrólise (K).



XXII CONGRESSO
BRASILEIRO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
23 a 26 de Setembro de 2018
Hotel Maksoud Plaza
São Paulo – SP



XVII ENCONTRO BRASILEIRO
SOBRE O ENSINO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
27 a 28 de Setembro de 2018
USP
São Paulo – SP

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 apresenta o GH com relação aos diferentes pré-tratamentos aplicados ao substrato. Esse método foi efetuado com a intenção de melhorar a conformação da cadeia proteica do plasma sanguíneo, uma vez que, o mesmo na sua forma nativa, não se encontra em condições adequadas para atuação da enzima protease (WANASUNDARA et al., 2002). O tempo total da hidrólise foi de 8 h, no entanto, optou-se por analisar o GH nas 6 h de reação, tempo em que o valor do GH se estabilizou.

Ao observar a Figura 1, nota-se que os valores de GH não apresentaram diferença estatística ($p>0,05$) entre os pré-tratamentos nas temperaturas de 50°C e 70°C. Em vista do gasto energético ser reduzido à 50°C, optou-se por prosseguir as análises fixando essa temperatura de pré-tratamento. Os pré-tratamentos a 90°C e banho ultrassônico (US50) foram considerados ineficazes à ação enzimática pela protease P45. O primeiro citado, em função da alta temperatura, pode ter degradado e afetado a conformação da cadeia proteica do plasma. Este comportamento se distingue entre diferentes substratos, na hidrólise da β -Lg e da α -La, empregando-se as enzimas pronase e pancreatina, respectivamente, SCHMIDT e POOL (1991) observaram que a desnaturação proteica através do pré-aquecimento do soro proteico a 95°C por 10 min tornou a proteína altamente susceptível a ação da enzima no primeiro caso, porém a susceptibilidade foi fortemente diminuída no segundo.

Com relação à aplicação de ondas ultrassônicas, o efeito aplicado aos substratos xilana e celulose foram favoráveis à ação das enzimas xilanase e celulase, respectivamente, promovendo um aumento da atividade enzimática (DALAGNOL et al., 2017). Diferentemente, a mudança na cadeia proteica induzida pelo pré-tratamento ultrassônico no substrato plasma, não possibilitou uma acessibilidade eficaz da protease P45 no rompimento das ligações peptídicas em comparação aos outros tratamentos aplicados.

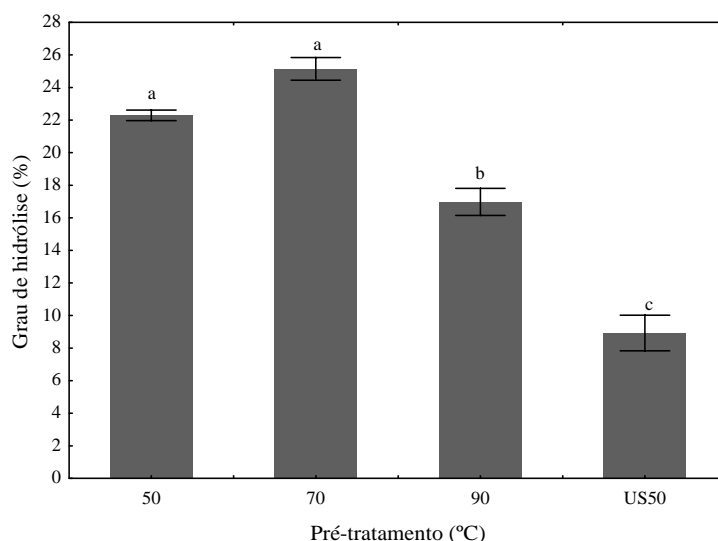


Figura 1 – Grau de hidrólise durante 6 h de reação para os ensaios de pré-tratamento no substrato plasma sanguíneo bovino. Média \pm erro padrão. Letras minúsculas iguais indicam que não há diferença significativa entre as médias dos ensaios ($p>0,05$). US: banho ultrassônico com aquecimento.



XXII CONGRESSO
BRASILEIRO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
23 a 26 de Setembro de 2018
Hotel Maksoud Plaza
São Paulo – SP



XVII ENCONTRO BRASILEIRO
SOBRE O ENSINO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
27 a 28 de Setembro de 2018
USP
São Paulo – SP

4. CONCLUSÃO

Os pré-tratamentos aplicados ao plasma de sangue bovino influenciaram os valores de grau de hidrólise das cadeias peptídicas na reação catalisada pela protease P45. Apesar do pré-tratamento a 50°C não tenha diferido estatisticamente ($p>0,05$) da temperatura de 70°C, essa temperatura aplicada gera um menor gasto energético do processo, assim foi selecionada como pré-tratamento do substrato para dar continuidade aos estudos.

5. AGRADECIMENTOS

FAPERGS-PROBIC, FAPERGS, Capes e CNPq.

6. REFERÊNCIAS

- ADLER-NISSEN, J. Enzymic hydrolysis of food proteins. *Elsevier Appl. Sci. Publishers*, 1986.
- BAH CS, BEKHIT AA, MCCONNELL MA, CARNE A, Generation of bioactive peptide hydrolysates from cattle plasma using plant and fungal proteases. *Food Chem*, v. 213, p. 98-107, 2016.
- BAH CS, BEKHIT AA, CARNE A, MCCONNELL MA, Slaughterhouse blood: an emerging source of bioactive compounds. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf*, v. 12, p. 314-331, 2013.
- DALAGNOL LMG, SILVEIRA VCC, SILVA HB, MANFROI V, RODRIGUES RC Improvement of pectinase, xylanase and cellulase activities by ultrasound: Effects on enzymes and substrates, kinetics and thermodynamic parameters. *Process Biochem*, v.61, p.80–87, 2017.
- HIDALGO ME, DAROIT DJ, CORREA APF, PIENIZ S, BRANDELLI A, RISSO PH, Physicochemical and antioxidant properties of bovine caseinate hydrolysates obtained through microbial protease treatment. *Int J of Dairy Technol*, v. 65, p. 342-352, 2012.
- GONÇALVES SM, Hidrólise de caseína e plasma de sangue bovino com protease de *Bacillus* sp. P45. Dissertação. Universidade Federal do Rio Grande, 94 p., 2016.
- SALA L, GAUTÉRIO GV, YOUNAN FF, BRANDELLI A, MORAES CC, KALIL SJ, Integration of ultrafiltration into an aqueous two-phase system in the keratinase purification. *Process Biochem*, v. 49, p. 2016-2024, 2014.
- SCHMIDT DG, POLL JK, Enzymatic hydrolysis of whey proteins. Hydrolysis of α -lactoalbumin and β -lactoglobulin in buffer solutions by proteolytic enzymes. *Neth. Milk Dairy J*, v. 45, p. 225-240, 1991.
- TRUSEK A, LECH M, NOWORYTA A. Protein enzymatic hydrolysis integrated with ultrafiltration: Thermolysin application in obtaining peptides. *Chem. Eng. J*, v.305, p. 61-68, 2016.
- WANASUNDARA PKJPD, AMAROWICZ R, PEGG R, SHAND P. Preparation and characterization of hydrolyzed proteins from defibrinated bovine plasma. *J. Food Sci*, v. 67, p. 623-630, 2002.