

Capítulo 3

Proteases

Luciana Ferracini dos Santos • Maria Gabriela Bello Koblitz

- ▶ Introdução, 96
- ▶ Características gerais e modo de ação, 97
- ▶ Fontes e principais características, 100
- ▶ Aplicações industriais, 104
- ▶ Métodos de detecção da atividade, 126
- ▶ Bibliografia, 127

outras proteases). Em 1960, a protease alcalina produzida por *Bacillus licheniformis*, conhecida por subtilisina Carlsberg, foi incorporada a detergentes em pó; desde então, a indústria de detergentes é a maior consumidora de proteases.

A indústria de alimentos é a segunda maior consumidora de proteases e suas aplicações serão discutidas neste capítulo. Além das indústrias mencionadas, as proteases são também aplicadas na produção de couros, para a remoção de pelos e promoção de flexibilidade e maciez; nesse caso, são frequentemente usadas enzimas pancreáticas. As proteases são usadas também em diversas outras aplicações (Tabela 3.1); além de serem úteis em pesquisa básica para a elucidação da estrutura de proteínas.

Características gerais e modo de ação

As proteases são classificadas por sua estrutura e por critérios evolutivos e, atualmente, são representadas por 244 famílias e 55 clãs.¹ Alternativamente, proteases podem ser classificadas conforme seu modo de ação e/ou a

Tabela 3.1 Algumas aplicações de proteases.

Indústria	Protease	Aplicação
Bebidas	Papaína	Remoção de turvação
Detergentes	Protease alcalina, subtilisina	Fabricação de detergentes para lava-roupa, para remoção de manchas
Couro	Tripsina, outras proteases	Amaciamento do couro, remoção de pelos
Medicina	Tripsina Papaína	Remoção de tecidos necrosados, agente fibrinolítico. Tratamento de feridas
Fotografia	Várias proteases	Recuperação da prata usada em filmes fotográficos e de raios X
Têxtil	Queratinase	Possível substituição de método físico-químico convencional poluente para prevenção do encolhimento em lã
Farmacêutica	Protease de <i>Bacillus lentus</i> , <i>B. subtilis</i> ; <i>Bacillus</i> sp.	Prevenção da formação de misturas racêmicas na síntese de medicamentos
Cosméticos	Bromelina Queratinase	Tratamento anti-idade. Depilação

Adaptada de Santos *et al.*, 2017; Contesini *et al.*, 2017.

¹As informações estão disponíveis em <http://merops.sanger.ac.uk/index.htm>.

Proteases são classificadas em exopeptidases (amino- e carboxipeptidases) e endopeptidases, de acordo com seu modo de ação, e em serina-proteases, proteases sulfidrílicas, proteases aspárticas e metalo-proteases, de acordo com a natureza de seu sítio ativo.

natureza química do seu sítio catalítico (Tabela 3.2). De acordo com o modo de ação as proteases são divididas em dois grandes grupos: exopeptidases, que atuam nas extremidades da cadeia polipeptídica, e endopeptidases (ou proteinases), que agem em ligações no interior da cadeia proteica.

É importante ressaltar que enzimas classificadas no mesmo grupo, como a enzima subtilisina, que é uma serina-protease secretada por uma bactéria, tem seu mecanismo de ação igual ao de uma serina-protease de mamífero, mas as estruturas primária e terciária dessas enzimas são diferentes.

Exopeptidases

São classificadas de acordo com a extremidade da proteína a que se ligam para efetuar a hidrólise.

Amino-peptidases. Proteases que agem na extremidade N-terminal da cadeia polipeptídica; liberam aminoácidos livres, dipeptídeos ou tripeptídeos (Figura 3.2). Geralmente são metalo-proteases.

Carboxipeptidases. Proteases que agem na extremidade C-terminal da cadeia polipeptídica; liberam aminoácidos livres ou dipeptídeos (Figura 3.2). Podem ser serina-proteases, metalo-proteases ou cisteína-proteases.

Tabela 3.2 Classes de proteases.

Classe	Exemplo	Aminoácidos do sítio ativo
Serina-protease	Quimotripsina Subtilisina	His ⁵⁷ , Asp ¹⁰² , Ser ¹⁹⁵ Asp ³² , His ⁶⁴ , Ser ²²¹
Cisteína-protease	Papaína	Cys ²⁵ , His ¹⁵⁹ , Asp ¹⁵⁸
Protease aspártica	Pepsina de <i>Penicillium</i> sp.	Asp ³³ , Asp ²¹³
Metalo-protease	Carboxipeptidase A bovina	Zn, Glu ²⁷⁰ , Try ²⁴⁸

Asp: ácido aspártico; Ser: serina; His: histidina; Cys: cisteína; Glu: glutamina; Try: triptofano; Zn: zinco.

Endopeptidases

São normalmente classificadas pela natureza química de seu sítio ativo e por seu mecanismo de ação em quatro grupos distintos.

Serina-proteases (EC 3.4.21). São caracterizadas pela presença do aminoácido serina no sítio ativo. São inibidas irreversivelmente por 3,4-dicloroisocumarina (3,4-DCI), di-isopropilfluorofosfato (DFP), e fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF), entre outros. São, em geral, ativas em pH de 7,0 a 11,0 e podem apresentar atividade sobre ligações éster e amida. O principal grupo desse tipo de proteases é formado pelas serina-proteases alcalinas como tripsina, quimotripsina e subtilisina, que apresentam baixa especificidade de substrato. Dentre as serina-proteases, as de maior importância comercial são as subtilisinas, em especial a subtilisina Carlsberg, comercializada com o nome de alcalase.

Cisteína-proteases ou proteases sulfidrílicas (EC 3.4.22). Apresentam em seu sítio ativo os aminoácidos cisteína e histidina conjugados. São, normalmente, mais ativas em meios de pH neutro, podendo apresentar atividade em valores de pH ácidos. São ativadas na presença de agentes redutores e inativadas por agentes oxidantes, além de substâncias que reagem com grupo sulfidril, como *p*-cloromercuriobenzoato (PCMB). As proteases vegetais como papaína, bromelina e ficina são as principais cisteína-proteases.

Proteases aspárticas ou ácidas (EC 3.4.23). Contêm ácido aspártico em seu sítio ativo. São inibidas por 1,2-epóxi-3-*p*-nitrofenoxi propano (EPNP), na presença de íons de cobre. Em geral, apresentam maior atividade em valores de pH ácido e têm maior afinidade por ligações que envolvem aminoácidos apolares e aromáticos. Entre as principais proteases ácidas estão a pepsina e a renina, assim como proteases microbianas, sobretudo fúngicas (dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Neurospora*, *Endothia* e *Rhizomucor*).

Metallo-proteases (EC 3.4.24). São enzimas que dependem de íons metálicos divalentes (sobretudo Zn^{+2} , Co^{+2} e Mn^{+2}) para sua atividade. São inibidas na presença de agentes quelantes como ácido etilenodiaminotetra-acético (EDTA).

Serina-proteases são ativas em pH neutro e alcalino. Principais exemplos: tripsina, quimotripsina e subtilisina.

Proteases sulfidrílicas são ativas em pH neutro, principalmente. As proteases vegetais papaína, bromelina e ficina são os exemplos mais importantes.

Proteases aspárticas atuam em pH ácido. Dentre elas, as mais importantes são a pepsina e a renina.

Metallo-proteases podem ser neutras ou alcalinas. A principal representante dessa classe é a termolisina.

As metalo-proteases podem ser neutras ou alcalinas. Entre as neutras encontram-se as collagenases de *Clostridium histolyticum* e elastases de *Pseudomonas aeruginosa*, além da termolisina, uma protease neutra comercial de alta termorresistência, produzida por *Geobacillus stearothermophilus*. Entre as alcalinas, estão as proteases do gênero *Serratia*, por exemplo, com atividade em pH de 7,0 a 9,0.

Fontes e principais características

Por serem indispensáveis à vida, proteases são produzidas por todos os seres vivos: animais, vegetais e microrganismos.

Proteases vegetais

As proteases vegetais estão entre as mais empregadas na indústria de alimentos por serem consideradas seguras para o consumo humano e por serem tradicionalmente empregadas no preparo de diversos alimentos. Em geral, a atividade dessas proteases é maior nos vegetais verdes (imatu-ros), em comparação com as mesmas espécies em estado mais avançado de maturação. A papaína, a bromelina e a ficina estão entre as mais importantes cisteína-proteases e representam cerca de 5% do mercado mundial de proteases. Além dessas, que serão descritas e detalhadas a seguir, também são conhecidas a zingipaína (EC 3.4.22.67), extraída do rizoma de gengibre (*Zingiber officinale*), e a actinidina (EC 3.4.22.14), do kiwi (*Actinidia deliciosa*).

Papaína (EC 3.4.22.2). É uma cisteína-protease extraída do látex dos frutos do mamoeiro (*Carica papaya*). Geralmente é comercializada na forma de extrato bruto que contém diferentes proteases, entre as quais as mais importantes são a papaína e a quimopapaína (QP-A e QP-B), com características bastante semelhantes e que variam ligeiramente com a variedade plantada, o clima e o manejo, além do processo de extração/concentração utilizado. Normalmente, a papaína apresenta atividade proteolítica em valores de pH de 5,0 a 9,0. Para os substratos caseína e albumina, seu pH ótimo de atuação é 7,0. Sua atividade ótima é observada em temperaturas de 60 a 70°C; essa enzima permanece estável em

Proteases vegetais são muito usadas na indústria de alimentos por serem consideradas seguras para consumo. São mais abundantes nos frutos verdes que nos maduros.

temperaturas até 90°C. A papaína apresenta ainda atividade sobre ligações éster e amida, e tem boa atuação na síntese de peptídeos. Apresenta baixa especificidade de substrato e hidrolisa, preferencialmente, ligações envolvendo aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina), leucina e glicina em P1 (Figura 3.3), especialmente quando se encontra um aminoácido contendo um grupamento lateral apolar volumoso (valina, leucina e isoleucina) em P2. Além disso, a papaína não cliva ligações envolvendo o aminoácido valina em P1.

Bromelina (EC 3.4.22.4). Nome atribuído a duas cisteína-proteases semelhantes extraídas do pedúnculo e do fruto do abacaxizeiro (*Ananas comosus*), respectivamente. Têm atividade ótima em pH de 6,0 a 8,0, sendo menos termoestáveis que a papaína, perdendo rapidamente sua atividade em temperaturas superiores a 70°C.

Ficina (EC 3.4.22.3). É uma cisteína-protease menos disponível comercialmente que a papaína e a bromelina; é extraída do látex de diversas espécies do gênero *Ficus*. Apresenta maior atividade em valores de pH de 6,0 a 8,0 e em temperatura de 60°C. Assim como as outras proteases vegetais, a ficina apresenta baixa especificidade de substrato e hidrolisa ligações que envolvem diversos aminoácidos.

Proteases animais

As proteases animais estão entre as enzimas mais estudadas por seu interesse para a área de saúde. As mais importantes comercialmente são as proteases gástricas (quimosina ou renina e pepsina) e as pancreáticas (tripsina e quimotripsina).

Papaína, bromelina e ficina são proteases obtidas de frutos do mamoeiro, do abacaxizeiro e de espécies do gênero *Ficus*, respectivamente, que apresentam baixa especificidade. A papaína tem alta estabilidade térmica e é de maior disponibilidade no mercado.

As proteases animais mais importantes são as gástricas (renina e pepsina) e as pancreáticas (tripsina e quimotripsina).

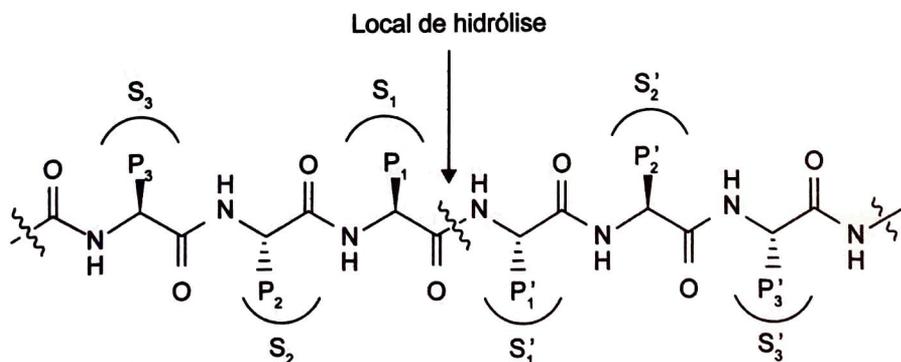


Figura 3.3 Representação esquemática e nomenclatura padrão para os substratos das proteases.

Renina é a protease animal de maior aplicação comercial. Apresenta alta especificidade e é obtida do quarto estômago de bezerras. Pepsina é a protease digestiva do estômago, cujo pH ótimo é de 1,8.

Quimosina (EC 3.4.23.4) ou renina. É uma das proteases que apresenta maior valor para a indústria de alimentos. É uma protease aspártica extraída do quarto estômago (abomaso) de bezerras não desmamados. A renina é extraída do estômago fresco ou seco, com o auxílio de solução de cloreto de sódio e de outros aditivos. Após a extração, a solução enzimática obtida pode ser adicionada de conservantes, precipitada e seca ou liofilizada. O método de extração utilizado é tradicional e característico de cada região produtora.

Como outras enzimas gástricas, a renina é sintetizada na forma de pró-renina inativa. A pró-renina é convertida em renina por hidrólise parcial, que libera um peptídeo de sua cadeia proteica. Essa hidrólise é espontânea em pH ácido (abaixo de 2,0) e acontece por autólise em pH em torno de 5,0, podendo ser catalisada também pela pepsina. A renina é inativada em pH neutro ou alcalino e perde gradualmente sua atividade em pH de 3,5 a 4,5 por autodigestão.

Pepsina (EC 3.4.23.1). Protease aspártica produzida pela mucosa do estômago na forma inativa de pepsinogênio. Em pH abaixo de 5,0 torna-se ativa por autólise. Em pH acima de 5,0, as partes do peptídeo que foram removidas para sua ativação funcionam como inibidores alostéricos reversíveis da pepsina, sendo removidos quando o pH cair novamente. Apresenta maior atividade na faixa de pH de 1,0 a 4,0, e seu pH ótimo é 1,8. Inativa-se completamente em pH superior a 6,0. Sua atividade é bastante influenciada pelo substrato. Apresenta baixa especificidade, no entanto prefere ligações peptídicas que envolvam aminoácidos hidrofóbicos, preferencialmente aromáticos em P1 e P1'.

Tripsina e quimotripsina são produzidas no pâncreas e agem no intestino. Sua atividade é controlada por inibidores de tripsina encontrados em diversos alimentos.

Tripsina (EC 3.4.21.4). Serina-protease secretada pelo pâncreas, é uma das enzimas digestivas mais importantes. É sintetizada na forma inativa de tripsinogênio no pâncreas de animais superiores e é ativada por hidrólise no duodeno. Essa hidrólise é catalisada por outras enteropeptidases ou pela própria tripsina. Sua regulação é feita pela síntese de inibidores de tripsina, também sintetizados pelo pâncreas e que controlam a ação dessa enzima quando ela está presente em pequenas quantidades. São endopeptidases altamente

específicas que só hidrolisam ligações que envolvem o grupo carboxílico dos aminoácidos lisina e arginina. São estáveis em pH abaixo de 6,0 e sofrem autólise a partir desse valor. Sua atividade ótima ocorre em pH de 7,0 a 9,0, característico do intestino.

Inibidores de tripsina são peptídeos produzidos pelo pâncreas, mas também presentes na soja, no trigo e outros alimentos, e que impedem a digestão de proteínas ingeridas com eles. Esses inibidores contidos em diversos alimentos e em rações devem ser considerados, pois eles reduzem expressivamente o valor nutricional do alimento.

Quimotripsina (EC 3.4.21.1). É uma serina-protease bastante semelhante à tripsina e também é sintetizada como zimogênio pelo pâncreas. Apresenta duas frações de propriedades semelhantes. Hidrolisa preferencialmente ligações que envolvem grupo carboxílico dos aminoácidos tirosina, triptofano, fenilalanina e leucina. É estável em pH ácido e neutro e apresenta pH ótimo de atividade de 7,0 a 9,0.

Catepsinas e calpaínas. São cisteína-proteases intracelulares relacionadas à resolução do *rigor mortis*. Serão discutidas em maiores detalhes no capítulo sobre a bioquímica da carne.

Proteases microbianas

Os microrganismos são excelentes fontes de enzimas, em razão da grande diversidade e relativa facilidade de produção em larga escala, além da possibilidade de secreção de enzimas extracelulares, de mais fácil recuperação e purificação. No passado, todas as enzimas comercializadas eram de origem animal ou vegetal. As enzimas microbianas vêm sendo introduzidas no mercado e, atualmente, estima-se que a maior parte das enzimas utilizadas seja de origem microbiana. As proteases microbianas são produzidas basicamente por bactérias ou fungos.

Origem bacteriana. A maior parte das proteases comerciais é produzida por bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Geobacillus*. As proteases bacterianas neutras são ativas em valores de pH de 5,0 a 8,0 e apresentam baixa estabilidade térmica. Embora geralmente apresentem baixíssima especificidade

Catepsinas e calpaínas são proteases intracelulares importantes para a transformação do músculo em carne após o abate.

Microrganismos são excelentes fontes de enzimas, em virtude de sua diversidade e possibilidade de produção em larga escala. Atualmente, a maior parte das enzimas comerciais é de origem microbiana.

Proteases bacterianas comerciais são, geralmente, neutras ou alcalinas, sendo estas últimas as principais enzimas utilizadas em detergentes. Uma única espécie de fungo filamentososo pode produzir proteases ácidas neutras e alcalinas (isoenzimas).

de substrato, o grau de hidrólise pode ser controlado por alterações no pH e na temperatura da reação proteolítica. As proteases bacterianas alcalinas apresentam maior atividade em pH de 8,0 a 11,0 e em temperaturas de 50 a 60°C. Em geral, têm baixa especificidade de substrato e são mais aplicadas na indústria de detergentes, por apresentarem estabilidade na presença de surfactantes.

Origem fúngica. Uma única espécie de fungo pode produzir diferentes proteases (alcalinas, neutras e ácidas). É o caso do *Aspergillus oryzae* que produz três proteases extracelulares, de modo que o extrato obtido por fermentação apresenta atividade proteolítica em valores de pH de 4,0 a 11,0. Sua temperatura ótima de atividade é observada em torno de 40°C e essas proteases são inativadas em temperaturas acima de 50°C. Em geral, as proteases fúngicas são ativas em pH de 4,0 a 4,5 e as neutras em pH 7,0; e essas são, geralmente, metalo-proteases.

Aplicações industriais

Clarificação de cerveja

Após a fermentação, a cerveja passa por um período de maturação a frio para destruição de diacetil. Nesse período e depois, no resfriamento pré-consumo, pode ocorrer turvação por insolubilização de peptídeos de alta massa molecular.

Após a fermentação alcoólica, a cerveja passa por um período de maturação a baixa temperatura (cerca de 0°C). A duração da maturação depende do tipo de cerveja, varia de poucos dias a várias semanas e sua principal finalidade é a destruição de diacetil, uma substância de sabor indesejado, que se acumula no produto durante a fermentação. Ao longo da maturação, o diacetil é transformado em acetoina, que não apresenta sabor. Esse processo pode ser acelerado pela adição de enzimas, como acetolactato-descarboxilases e diacetil-redutases.

Outro fenômeno que ocorre durante a maturação é a turvação da cerveja. Ela acontece pela interação de compostos fenólicos e polipeptídeos, provenientes do malte e de cereais não maltados, que se insolubilizam em temperatura baixa. A simples filtração desse precipitado não garante que não ocorra nova precipitação posteriormente, portanto é necessário um tratamento adicional com proteases. As proteases hidrolisam os polipeptídeos presentes e impedem que eles

Chillproofing é o processo de estabilização de cervejas para evitar a turvação pelo frio. Consiste na hidrólise dos peptídeos, provenientes do malte e de cereais não maltados, por proteases de baixa especificidade. O resultado da hidrólise, de baixa massa molecular, permanece solúvel mesmo em baixas temperaturas.

se insolubilizem, evitando a turvação. Em geral, no processo de clarificação são usadas papaínas, que são proteases com baixa especificidade e hidrolisam peptídeos de diferentes fontes. A papaína tem bom preço no mercado e seu uso é permitido em alimentos. Além disso, a papaína apresenta alta termoestabilidade, permanecendo ativa após a operação de pasteurização e também ao longo da vida de prateleira do produto. A operação de *chillproofing* é utilizada pela maior parte das cervejarias que comercializam cerveja clarificada. Em alguns casos, o uso de papaína vem sendo substituído pela aplicação de proteases microbianas.

É importante notar que a presença de proteínas é vital para a formação da espuma em cervejas e, em geral, essas moléculas devem apresentar alta massa molecular. Segundo Slaughter e Priest (1991), a adição de papaína à cerveja não afeta a formação de espuma, pois as substâncias envolvidas nesse processo são moléculas complexas, formadas por resíduos de polipeptídeos, polifenóis e carboidratos além de fosfato, não constituindo substrato para a papaína.

Amaciamento da carne (tenderização enzimática)

Maciez é a característica mais desejada em carnes e diferencia a carne "de primeira" da carne "de segunda". Pode ser alcançada por longos períodos de maturação, que elevam o custo da carne.

Tenderização enzimática é o processo de amaciamento da carne pela ação de proteases de baixa especificidade. A hidrólise das proteínas dos tecidos conjuntivo e miofibrilar garante a alteração necessária na textura.

A maciez é a característica mais desejada em carnes. É definida como o "atributo da carne cozida de ter fácil mastigabilidade sem perder sua textura característica". O método convencional de se atingir a maciez é através da maturação prolongada. O tempo normal de comercialização de carcaças bovinas é de 3 a 5 dias após o abate. Para uma tenderização satisfatória são necessários de 10 dias a 4 semanas de maturação dependendo da peça, da qualidade da carcaça, da idade do animal abatido, entre outros fatores. O custo eleva-se em decorrência do longo tempo de armazenamento a frio, da redução do peso por ressecamento e da possibilidade de desenvolvimento de características organolépticas indesejadas.

Uma possibilidade de acelerar esse processo é a aplicação de proteases que irão hidrolisar as proteínas da carne, tornando-a mais macia. Dentre as enzimas proteolíticas, as de origem vegetal são as mais utilizadas para esse fim. Entre essas proteases, a mais aplicada é a papaína. Apesar

de apresentar menor atividade sobre o colágeno que a bromelina e a ficina, a papaína é bastante eficiente por sua alta afinidade pela actina e boa atividade sobre o colágeno desnaturado pelo calor. A papaína apresenta ainda as seguintes vantagens: fornecimento regular no mercado a preços acessíveis, temperatura de atividade entre 60 e 70°C, o que evita haver hidrólise durante o armazenamento da carne a frio, e alta estabilidade térmica, garantindo o amaciamento durante o cozimento, pois a enzima mantém-se ativa por longo período a altas temperaturas.

.....
A dosagem de enzima depende da finalidade do corte: peças assadas devem receber menos enzimas que as destinadas à fritura.

A dosagem de enzima deve ser avaliada de acordo com a finalidade do corte. Peças que serão assadas passam mais tempo na temperatura de atividade da enzima durante o cozimento e devem, portanto, receber menores quantidades da enzima. Os cortes destinados à fritura, que atingem temperaturas muito altas em menores intervalos de tempo, devem receber maiores quantidades de enzima para um amaciamento satisfatório.

Nas carnes destinadas a restaurantes e serviços de alimentação, que sofrem longo tempo de aquecimento, é usada uma mistura de papaína e bromelina. A bromelina é bem menos termorresistente e é inativada após certo período de aquecimento, o que evita a hidrólise excessiva.

.....
A maior dificuldade apresentada pela tenderização enzimática está na difusão da enzima pela peça de carne. A metodologia de aplicação da enzima deve visar sua distribuição uniforme.

A maior dificuldade apresentada pela tenderização enzimática é a distribuição uniforme da enzima na peça de carne. Algumas metodologias foram desenvolvidas para esse fim: o método clássico, a imersão, a injeção e a injeção no animal vivo.

Método clássico. Aplicação superficial da enzima em veículo de sal. É um método barato e de baixo custo, mas apresenta problemas de difusão da enzima no corte e necessita do uso de sal ou de outro veículo sólido. É o método utilizado para produtos de uso doméstico de amaciamento de carne (Figura 3.4).

Por imersão. Os cortes de carne são submersos na solução de enzima. É um método bastante prático e que permite a automação. Apresenta problemas de difusão, contaminação cruzada e a possibilidade de diluição da solução enzimática pelos sucos da carne.

Ingredientes

Sal, vegetais desidratados (cebola, alho e salsa), açúcar, **papaína**, pimenta-do-reino, realçador de sabor glutamato monossódico E621 e antiemectante dióxido de silício E551. **NÃO CONTÉM GLÚTEN.**

CUIDADOS PARA A BOA CONSERVAÇÃO: Guardar a embalagem em local seco, ventilado e protegido de insetos e roedores. Se não utilizar todo o conteúdo, manter a embalagem bem fechada, guardando-a em recipiente fechado ou amarrando-a.

Após abrir a embalagem, utilizar o produto dentro de, no máximo, 15 dias.

Figura 3.4 Rótulo de produto comercial para amaciamento de carne com o ingrediente ativo (papaína) em destaque.

Por injeção. Uso de seringas ou pistolas para aplicação de solução enzimática na peça de carne. Pode ser usado em peças maiores, destinadas ao preparo de assados. A injeção malfeita pode ocasionar a formação de bolsas mais macias dentro da peça.

Por injeção no animal vivo. Essa técnica, também chamada pré-tenderização, consiste na injeção feita na jugular do animal de 10 a 30 min antes do abate. Proporciona distribuição uniforme da enzima em todos os tecidos, através da corrente sanguínea. Depende de pessoal especializado e do uso de enzima purificada para evitar resposta imunológica no animal vivo. Em princípio, a enzima não apresenta atividade na temperatura do corpo do animal e só seria ativada quando o corte da carne fosse aquecido durante o cozimento. No entanto, para garantir que não haja nenhuma possibilidade de hidrólise dos tecidos do animal vivo, a enzima é inativada antes da injeção por meio de um tratamento prévio com peróxido de hidrogênio. Esse reagente oxida o sítio ativo da enzima e impossibilita qualquer atividade catalítica no animal vivo. O excesso de peróxido de hidrogênio deve ser removido antes da injeção pela ação de catalases. Quando o animal é abatido, a tensão de oxigênio nos tecidos cai muito, favorecendo a redução do sítio ativo da papaína, que volta a ser ativa. Entretanto, atividade de hidrólise significativa só ocorre quando a peça de carne é aquecida acima de 60°C. Esse processo é utilizado em alguns países produtores, em uma pequena porção do rebanho, para produção de carne de maciez certificada.

O futuro da tenderização enzimática reside, muito provavelmente, na aplicação de colagenases e elastases recombinantes. A ação conjunta dessas enzimas sobre o tecido conjuntivo dos cortes de dianteiro bovino poderia transformar a carne "de segunda" em carne "de primeira".

A caseína, uma mistura de fosfoproteínas (α_{s1} -, α_{s2} -, β - e κ -caseínas), está organizada em micelas que se mantêm em suspensão coloidal.

As micelas contêm, em sua fração interna, as caseínas fosfatadas que precipitam na presença de cálcio e, em sua parte externa, a κ -caseína, que é estável ao cálcio e protetora do estado coloidal das outras frações.

A distribuição uniforme por todo o corpo do animal tem também efeitos indesejados: pode provocar a perda de órgãos de interesse comercial, como fígado e rins, pela tenderização desses tecidos. Para minimizar esse problema, alguns autores sugeriram o uso de colagenases microbianas nesse tipo de amaciamento. Essas enzimas apresentam atividade quase que exclusiva sobre o colágeno, favorecendo o amaciamento de peças cuja dureza é causada por excesso de tecido conjuntivo intramuscular, porém não são capazes de acelerar a tenderização do tecido miofibrilar. No entanto, colagenases não estão disponíveis comercialmente para uso em alimentos por serem secretadas, em sua maioria, por gêneros de bactérias potencialmente patogênicas (*Vibrio* e *Clostridium*), sendo consideradas um fator de virulência.

Coagulação do leite

A produção de queijos baseia-se, inicialmente, na separação das caseínas e gordura do leite da fração que constitui o soro. O soro é formado, em sua maior parte, por água, lactose, sais e outras proteínas não caseínas. Para maior compreensão dos métodos de separação da caseína, será inicialmente discutido o modelo de estrutura micelar proposto para a caseína do leite.

Segundo o modelo de estrutura mais aceito, chamada de "bola de macarrão" ou "novelo de lã", a caseína do leite está organizada em micelas que se mantêm em suspensão coloidal. A caseína é uma mistura de fosfoproteínas muito semelhantes: α_{s1} -, α_{s2} -, β - e κ -caseínas. As micelas são compostas, em sua parte interior, por frações de caseína altamente fosfatadas, que precipitam na presença de íons cálcio e, em sua parte externa, pela κ -caseína, que é pouco fosfatada e é estável na presença de íons cálcio. A κ -caseína mantém a estabilidade das micelas, pois é a protetora do estado coloidal das outras frações (α_{s1} , α_{s2} , β) da caseína (Figura 3.5).

O primeiro destaque da Figura 3.5 corresponde à extremidade carboxiterminal da κ -caseína, que se dirige para fora da micela, formando uma camada de "pelos" que previne a agregação com outras micelas e apresenta al

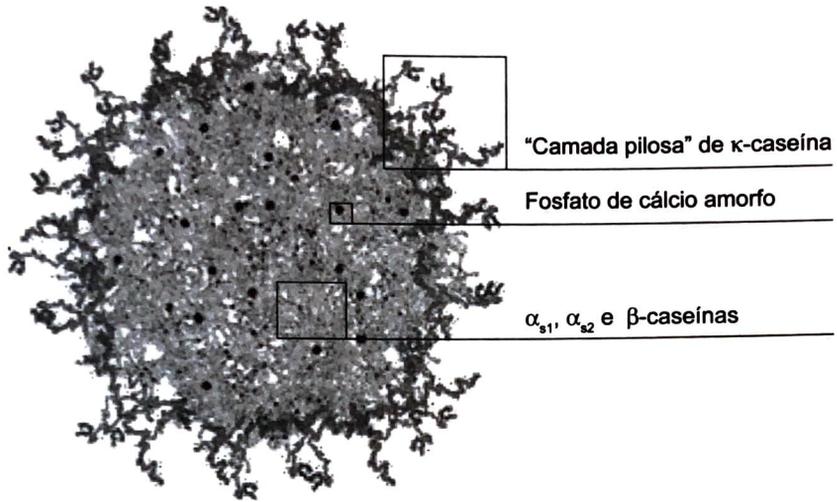


Figura 3.5 Modelo proposto para estrutura micelar da caseína no leite. Adaptada de Holt; Horne, 1996.

solubilidade em água (em virtude da glicosilação da extremidade C-terminal), aumentando a dispersibilidade das micelas na matriz aquosa do leite. É importante salientar que a estrutura micelar ainda é objeto de estudo e discussão. Outros estudos propuseram que as micelas não são estruturas fixas. Observou-se que mudanças no pH, temperatura e força iônica promovem alterações na sua distribuição e na proporção de proteína livre.

A precipitação das caseínas do leite pode ser obtida de duas maneiras: por *precipitação isoelétrica* e por *proteólise limitada*.

Precipitação isoelétrica. Acontece por redução do pH do leite para valores em torno de 4,6 através da adição de ácido láctico (acidificação direta) ou pelo uso de culturas lácticas, chamadas culturas *starter*, que fermentam lactose, produzindo ácido láctico e outros ácidos orgânicos (acidificação *in situ*). Ao atingir o pH de 4,6, correspondente ao ponto isoelétrico médio das caseínas do leite, ocorre a insolubilização dessas proteínas, que precipitam.

Proteólise limitada. Quando a κ -caseína sofre hidrólise, os íons de cálcio do leite ligam-se às frações fosfatadas da caseína, formando ligações cruzadas e provocando sua precipitação na forma de coágulos (caseinato de cálcio). Entretanto, se a hidrólise não for limitada, haverá destruição dos coágulos e

A precipitação das caseínas do leite pode ser obtida por precipitação isoelétrica, que ocorre quando o pH do leite atinge o ponto isoelétrico das caseínas (4,6), ou por proteólise limitada, pela ação de proteases específicas.

.....

O desempenho de uma protease na coagulação do leite para a produção de queijo pode ser avaliado pela relação entre sua capacidade de coagulação e a hidrólise total das caseínas do leite.

.....

A pepsina suína é comercializada em misturas com quimosina na proporção de 50:50 e 20:80. Nos "coalhos microbianos" são aplicadas proteases ácidas de *Rhizomucor*, *Aspergillus* e *Endothia*. A renina bovina já foi expressa em fungos filamentosos, leveduras e bactérias. Não há aplicação industrial para a renina imobilizada.

solubilização de pequenos peptídeos, o que irá afetar seriamente a textura do queijo e seu rendimento, com perda de caseína para o soro. Além disso, a hidrólise excessiva pode ocasionar a liberação de peptídeos contendo aminoácidos hidrofóbicos na extremidade carboxiterminal. Esses peptídeos apresentam sabor amargo e interferem na qualidade do produto final.

O desempenho de uma protease na coagulação do leite para a produção de queijo pode ser avaliado pela relação entre a capacidade para formar coágulo e a hidrólise total das caseínas do leite. Historicamente, a enzima mais utilizada nesse processo é a quimosina. A quimosina apresenta altíssima especificidade pela ligação peptídica entre os aminoácidos fenilalanina (105) e metionina (106) da κ -caseína, cuja hidrólise é suficiente para desestabilizar a micela de caseína, liberando a *para*- κ -caseína e um glicopeptídeo C-terminal – única parte que migra para o soro. Além disso, essa enzima só é capaz de hidrolisar uma quantidade extremamente limitada de outras ligações nas frações de caseína e essas reações acontecem de forma bastante lenta. A quimosina atua em uma faixa de pH limitada, fora da qual sofre autólise rapidamente. Em consequência disso, essa enzima tem uma ótima capacidade de coagulação do leite: promove a hidrólise limitada e proporciona coágulos de textura excelente, sem geração de sabor amargo e com alto rendimento.

Uma vez que o custo da quimosina é relativamente alto e sua oferta no mercado é insuficiente para suprir a demanda, substitutos de quimosina podem ser aplicados industrialmente. Uma possibilidade é o uso de pepsina suína que comercializada em misturas com quimosina na proporção de 50:50 e 20:80, alcança bastante sucesso na coagulação do leite. Por ser rapidamente inativada em valores de pH em torno de 6,5 (pH do leite), essa protease perde sua atividade durante a coagulação, não promovendo proteólise excessiva. Entretanto, por ter afinidade por ligações que envolvem aminoácidos hidrofóbicos, a pepsina tende a provocar surgimento de sabor amargo indesejado.

Proteases ácidas de *Rhizomucor miehei*, *Rhizomucor pusillus*, *Aspergillus oryzae* e *Endothia parasitica* apresentam

especificidade suficientemente semelhante à da quimosina para serem capazes de produzir coágulos de boa qualidade, sendo inclusive conhecidas como “coalhos microbianos”. No entanto, essas proteases são bem resistentes a diferentes condições de temperatura e pH, sofrem pouca ou nenhuma autólise e provocam proteólise excessiva, o que diminui o rendimento do processo e causa sabor amargo durante o período de maturação. Para minimizar esses efeitos, as enzimas podem ser submetidas a tratamento com peróxido de hidrogênio, que converte os resíduos de metionina em sulfóxidos, reduzindo sua estabilidade térmica à temperatura de 10°C. Evitam-se, dessa forma, os efeitos negativos, mas aumenta-se o custo de obtenção, tornando-as menos competitivas em relação à quimosina bovina. Os coalhos microbianos já são usados na produção de queijos desde 1970 e têm sido aplicados em larga escala nos EUA desde então. Cerca de 30% da produção mundial de queijos se utilizam de proteases microbianas. A presença de proteases durante a maturação de alguns queijos não é totalmente indesejada, pois elas participam da promoção do *flavor* e da textura característicos de certos tipos de queijo.

Outra forma para se obter a quimosina bovina é a clonagem do gene responsável por sua codificação em diferentes leveduras, bactérias e fungos como: *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli* e *Aspergillus niger*, que já produziram a enzima com sucesso. Esse tipo de quimosina se encontra disponível no mercado e, de acordo com o *site* da Universidade de Reading,² 90% do queijo comercializado no Reino Unido é obtido com uso de quimosina recombinante produzida por microrganismos geneticamente modificados.

Após o processo de coagulação, a maior parte da quimosina utilizada se perde para o soro. Para minimizar a perda, o uso da enzima imobilizada permitiria sua recuperação e reutilização. Entretanto, todas as tentativas de imobilização da quimosina geraram produtos de baixa atividade ou apresentaram dificuldade de difusão, o que impediu sua produção em escala comercial.

²Disponível em <http://www.ncbe.reading.ac.uk>.

.....

A maturação de queijos é, tradicionalmente, uma forma de preservar o valor nutricional do leite, por maiores períodos de tempo, em um produto palatável.

.....

A maturação de queijos consiste em alterações de aroma, sabor e textura causadas pela ação de diversas enzimas. Proteases agem sobre a textura e na liberação de aminoácidos que serão transformados em compostos de *flavor*: aldeídos, aminas, ácidos.

Maturação acelerada de queijos

A maturação de queijos é, tradicionalmente, uma forma de preservar o valor nutricional do leite, por maiores períodos de tempo, em um produto palatável. É importante ressaltar que nem todos os componentes do leite são concentrados no queijo. Os componentes hidrossolúveis, como lactose, sais e vitaminas, ficam dissolvidos no soro, e diversas proteínas não caseínas não coagulam juntamente com a caseína, ficando também no soro.

Durante a produção, diversos tipos de queijos passam por longos períodos de maturação até atingir as características desejadas. Esse longo período implica alto custo com o armazenamento e demora no retorno do investimento, que só ocorre quando o produto chega ao mercado. Em virtude disso, grandes empresas produtoras de queijo vêm investindo em metodologias inovadoras para acelerar a maturação.

O processo de maturação exige condições de temperatura e umidade controladas e consiste na decomposição de gorduras, proteínas e carboidratos da massa do queijo provocada pela presença da cultura *starter* (bactérias lácticas), do coalho e de eventuais microbiotas secundárias. A quimosina libera peptídeos de alta massa molecular, mas não aminoácidos livres. As importantes modificações de textura e aroma no queijo são devidas, principalmente, à presença de proteases que geram peptídeos, aminoácidos, aminas, compostos sulfurados e tiol-ésteres, e às lipases que geram ácidos graxos, cetonas e lactonas.

A proteólise é um dos mais importantes processos de maturação de queijos, pois os peptídeos e aminoácidos livres, gerados pela ação de proteases, são precursores de sabor, além de serem fontes de nitrogênio para a microbiota secundária (Figura 3.6).

Os aromas de origem proteolítica resultam de reações bioquímicas posteriores dos aminoácidos livres, tais como desaminação, transaminação e descarboxilação, que geram aldeídos, aminas, alcoóis e ácidos, compostos característicos de aroma.

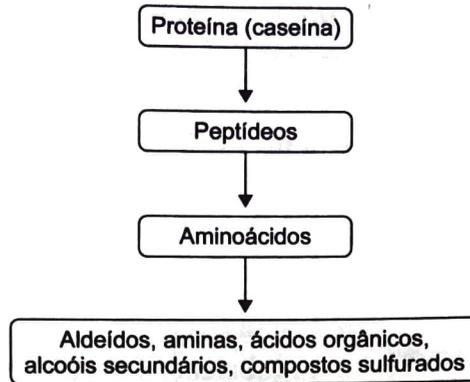


Figura 3.6 Origem de compostos de aroma a partir da ação de protease.

As principais empresas a investirem nesse tipo de tecnologia são as grandes produtoras americanas de queijo tipo *cheddar*, cujo volume de produção torna o custo da maturação tradicional um grave problema. As primeiras tentativas de se incorporar proteases a queijos *cheddar* produziram sabor amargo e provocaram colapso da estrutura do queijo, gerando um produto inaceitável. Sabe-se, hoje, que é necessária a incorporação de uma pequena quantidade de proteases neutras, geralmente de origem bacteriana (*Bacillus amyloliquefaciens*), que irão hidrolisar as proteínas da massa de forma limitada, produzindo uma textura desejável e gerando peptídeos livres. As proteases neutras têm vida ativa muito curta nas condições existentes na massa inicial, sendo rapidamente inativadas, o que evita a proteólise excessiva. Em conjunto com essas proteases, devem ser incorporadas exopeptidases, que apresentam baixa afinidade por peptídeos de alta massa molecular e interferem muito pouco na textura do queijo. Sua principal finalidade é atacar os peptídeos menores, liberados pela ação de proteases neutras, produzindo aminoácidos livres responsáveis pela formação dos compostos de aroma e sabor.

A maior dificuldade do uso de proteases na aceleração da maturação de queijo *cheddar* é a distribuição/difusão das enzimas na massa. Idealmente, essas enzimas deveriam ser incorporadas ao leite, antes da coagulação. No entanto, sua presença interfere na qualidade e no rendimento do coágulo, além de haver grande perda de enzimas para o soro. Por isso, vem sendo avaliada a microencapsulação

Na maturação acelerada são incorporadas proteases neutras e exopeptidases à massa inicial. As primeiras provocam as alterações desejadas na textura, e as últimas liberam aminoácidos precursores de aroma e sabor.

A maior dificuldade no processo de maturação acelerada está na difusão das enzimas na massa. A melhor forma de aplicação é o uso de enzimas microencapsuladas.

.....
 A maior aplicação comercial está na produção de "massas de queijo" utilizadas para aromatizar molhos, sopas, *snacks* etc.

das enzimas em lipossomas, que possam ser rompidos por controle externo, por meio da mudança na temperatura, por exemplo. As microcápsulas poderiam ser adicionadas ao leite ou à coalhada, minimizando perdas de enzimas, pois os lipossomas, quando adicionados ao leite, precipitam quase totalmente junto com a caseína.

A maturação acelerada tem grande aplicação na produção de massa (*slurry*) de queijo, que é utilizada como ingrediente na fabricação de biscoitos, molhos, sopas, *snacks*, entre outros. Para esse tipo de produto, a textura não apresenta importância, mas o desenvolvimento do aroma é sua característica mais importante. Esses aromas são produzidos pela ação de proteases, lipases, transaminases, entre outras enzimas. Existem no mercado massas com sabor de diversos tipos de queijo (*gorgonzola*, *cheddar*, *parmesão*) obtidos por processamento enzimático.

Panificação

.....
 A fração proteica do trigo, que gera o glúten, dá à farinha a propriedade de formar uma massa viscoelástica capaz de reter o ar.

As farinhas de trigo para uso industrial são classificadas de acordo com seu conteúdo de proteína, que pode variar entre 5 e 20%. Essa variação se deve a fatores genéticos, ambientais e de manejo. A fração proteica do trigo, que gera o glúten, é formada por dois constituintes principais: glutelina, uma proteína fibrilar, capaz de se dispor na forma de rede, e gliadina, proteína globular que interage com a glutelina. Essas proteínas dão à farinha a propriedade de formar uma massa viscoelástica com capacidade de reter o ar. A força do glúten é uma função da concentração dessas proteínas e da sua composição.

A rede do glúten é formada por ligações do tipo pontes de dissulfeto, e, quanto maior o número dessas ligações, mais difícil será trabalhar a massa. A quantidade de proteína na farinha e a proporção de seus constituintes determinam as características de extensibilidade e elasticidade da massa e do produto final. Uma massa de pão contendo pouco glúten será pegajosa e grudenta, e produzirá um pão duro de pouco crescimento. Entretanto, uma massa de bolo com muito glúten gerará um produto pouco macio, incapaz de se expandir pela ação do gás produzido pelo fermento químico.

A massa de pão com glúten fraco produzirá um pão duro e que cresce pouco (não retém o ar). A massa de bolo com glúten forte será incapaz de se expandir pela ação do fermento químico.

É possível modificar as propriedades do glúten e reduzir sua força pela adição de produtos químicos, como metabissulfito de sódio, que tornam a farinha mais adequada à finalidade desejada (produção de bolos, biscoitos, por exemplo). A utilização desse produto químico é regulamentada por legislação específica e proibida em alguns países. Uma alternativa é a utilização de proteases com a mesma finalidade. As proteases modificam a rede proteica pela quebra das ligações peptídicas. A extensão da quebra depende do tipo de protease utilizada, da sua concentração e do tempo de reação. A utilização de protease nos processos de panificação fornece produtos mais macios, de menor densidade e de aparência agradável, além de eliminar o sabor (*after taste*) provocado pelo metabissulfito.

O processo de produção do pão envolve uma etapa de trabalho mecânico, cuja finalidade é o rompimento das cadeias polipeptídicas do glúten para que a rede formada por essas proteínas não impeça o crescimento da massa. O uso de proteases que hidrolisam os constituintes do glúten reduz o tempo de trabalho mecânico em até 30%, sem prejuízo da elasticidade da massa e com possível melhoria do aroma do produto final. Nesses casos, é indispensável uma análise prévia do conteúdo de glúten da farinha para evitar riscos de hidrólise excessiva ou trabalho mecânico desnecessário da massa, que podem provocar efeitos indesejáveis no produto final.

As proteases de *Aspergillus oryzae* e *A. niger* são utilizadas para esse fim por serem consideradas seguras para o consumo e por apresentarem baixa especificidade, além de serem menos ativas que as proteases vegetais, o que garante a integridade do glúten. A aplicação das proteases é feita durante a fase de fermentação, para que haja tempo para sua ação, uma vez que serão inativadas na temperatura do forno. Esse processo é aplicado em escala industrial no mundo todo, e vem sendo utilizado nos EUA desde a década de 1970.

A hidrólise enzimática permite a liberação de grupos $-NH_2$ pelo rompimento das ligações peptídicas. Esses grupos podem reagir com o açúcar usado na formulação ou

Proteases podem ser aplicadas no controle da força do glúten, garantindo menor tempo de trabalho da massa na produção de pães (enzimas fúngicas) e redução do teor de glúten para produção de bolos e biscoitos (enzimas vegetais e/ou bacterianas).

produzido pela α -amilase, sendo responsáveis pelo desenvolvimento do *flavor* e da cor característica do pão através da reação de Maillard.

Em biscoitos do tipo *cracker*, o uso de proteases de *Aspergillus oryzae* permite uma abertura homogênea da massa e evita a deformação do produto no forno. Na produção de bolos e *wafers*, que exigem farinhas com baixo conteúdo de proteína, o uso de proteases vegetais pode substituir a aplicação de metabissulfito de sódio. Nesses casos é indicado o uso de papaína ou bromelina, sendo esta última mais efetiva que a primeira. O uso de protease neutra de *Bacillus subtilis* também é indicado.

.....
A hidrólise do glúten de farinhas com alto teor de proteína dá origem a produtos com maior valor nutricional em comparação com o uso de farinhas de baixo conteúdo proteico.

Além disso, a utilização de proteases em farinhas com alto teor de proteína dará origem a produtos com maior valor nutricional do que aqueles obtidos de farinhas com baixo teor original de proteína.

Modificação de proteínas

As proteínas podem ser modificadas por hidrólise, síntese e reestruturação.

► Hidrólise

Os hidrolisados proteicos são utilizados como ingrediente em vários alimentos, com o objetivo de conferir sabor característico, alterar a textura, emulsificar, produzir espuma ou aumentar o valor nutricional. Comercialmente, eles podem ser obtidos por hidrólise química ou enzimática de diferentes fontes proteicas. As características do produto são determinadas pelas condições de hidrólise, pela especificidade da enzima utilizada e pela fonte da proteína.

.....
Hidrolisados proteicos são obtidos pela ação de proteases específicas sobre diversas fontes proteicas com o objetivo de gerar compostos com diferentes funcionalidades: aromatizantes, espumantes, emulsificantes.

Hidrolisados de carne bovina e peixe são usados como flavorizantes na produção de temperos, caldos, sopas e molhos. Vários alimentos orientais, como *missô* e *shoyu*, têm seu sabor característico devido à hidrólise de proteínas insolúveis da soja, ou de misturas de soja e trigo, arroz, aveia ou centeio, em polipeptídeos solúveis. São utilizadas proteases de *Aspergillus oryzae* e *A. sojae* para esse fim.

.....
Vários alimentos orientais devem seu sabor característico à hidrólise de proteínas insolúveis da soja em peptídeos solúveis.

A soja é uma conhecida fonte de proteína vegetal, mas o uso dessa proteína é restrito devido à sua baixa funcionalidade. A hidrólise das proteínas de soja utilizando-se preparações comerciais de protease tem se mostrado capaz de melhorar essas propriedades. A proteína modificada pode ser usada para o enriquecimento de vários alimentos.

Hidrolisados de glúten podem substituir sólidos do leite em vários produtos de panificação. Em massas para pão, acentuam o aroma e melhoram as características do miolo. Hidrolisados de caseína são usados em produtos antialérgicos, indicados para pessoas com intolerância às proteínas do leite de vaca, sem prejuízo do valor nutricional. Fosfopeptídeos originados por hidrólise da α -caseína são usados para favorecer a absorção de cálcio pelo intestino humano.

Hidrolisados de albumina do ovo são aplicados como emulsificantes em alimentos formulados e hidrolisados de proteínas do soro, pela ação de tripsina, e hidrolisados de proteínas de soja, pela ação de alcalase, são usados para o enriquecimento de alimentos e rações.

Em alguns casos, a hidrólise libera peptídeos cujo aminoácido C-terminal é hidrofóbico, principalmente isoleucina, valina e fenilalanina, o que confere ao produto sabor amargo. Esse problema pode ser controlado pela utilização de carboxipeptidases, como a carboxipeptidase A de pâncreas de bovinos, que apresenta alta especificidade para esse tipo de aminoácido. Outra enzima utilizada é a alcalase, uma protease comercial produzida por *Bacillus liqueniformis*, que apresenta alta especificidade por proteínas que possuem aminoácido hidrofóbico C-terminal, eliminando o sabor amargo.

Para que possam servir à sua função, os hidrolisados proteicos devem ter grau de hidrólise controlado e, para tanto, as condições de reação também deverão ser rigorosamente controladas. O pH ótimo de atividade da enzima deve ser observado e a concentração de substrato deve ser inferior a 10%, preferencialmente 1%, para prevenir a possibilidade da reação inversa denominada síntese de plasteína.

As indústrias farmacêutica e de alimentos têm mostrado grande interesse em peptídeos obtidos por hidrólise proteica

Alguns peptídeos obtidos por hidrólise enzimática apresentam atividade antioxidante, anti-inflamatória e/ou antibacteriana e são aplicados em alimentos funcionais. Hidrolisados de proteínas do leite são indicados para pessoas com problemas de alergia ao leite de vaca e para favorecer a absorção de cálcio no intestino.

O consumo de peptídeos bioativos pode reduzir riscos de doenças e melhorar a saúde. Foram estudados peptídeos bioativos que apresentam ação sobre os sistemas cardiovascular, digestório, endócrino, nervoso e imunológico.

Tem sido estudada a hidrólise de proteínas por enzimas de fontes vegetal, animal e microbiana, comerciais ou não. A especificidade da protease usada na produção de peptídeos bioativos é um fator de grande relevância para a condução à sequência peptídica desejada.

A pressão sanguínea é regulada por uma "cascata" de reações enzimáticas específicas, conhecida como sistema renina-angiotensina. Diversos peptídeos bioativos obtidos por hidrólise de proteínas alimentares já mostraram atividade anti-hipertensiva pela inibição de enzimas do sistema renina-angiotensina, especialmente da ECA I.

que apresentam atividade biológica. O consumo de peptídeos bioativos pode reduzir riscos de doenças e melhorar a saúde. Foram estudados peptídeos bioativos que apresentam ação sobre os sistemas cardiovascular, digestório, endócrino, nervoso e imunológico, e que podem auxiliar na prevenção de hipertensão arterial, diabetes e obesidade, por exemplo. Entre as funções biológicas estudadas desses peptídeos destacam-se as atividades anti-hipertensiva, antioxidante, antibacteriana, anti-inflamatória e estimulante do sistema imunológico.

Vários peptídeos bioativos podem ser obtidos por hidrólise da caseína do leite, glúten, proteína de soja, entre outras fontes proteicas. Tem sido estudada a hidrólise dessas proteínas por enzimas de fonte vegetal, como papaína e bromelina, de fonte animal, como pepsina, tripsina e quimotripsina, e por proteases microbianas comerciais ou não. A especificidade da protease usada na produção de peptídeos bioativos é um fator de grande relevância para a condução à sequência peptídica desejada. Proteases de baixa especificidade de substrato produzem peptídeos não previsíveis, por isso seu uso é preferível em processos que visem à obtenção de hidrolisados com alto grau de hidrólise. Entretanto, o uso de proteases com alta especificidade permite a previsão dos peptídeos liberados após a hidrólise. A liberação eficiente dos peptídeos bioativos desejados pode requerer a ação combinada de diferentes proteases, de forma complementar ou sequencial.

A hipertensão arterial é considerada uma doença crônica. A pressão sanguínea é regulada por uma "cascata" de reações enzimáticas específicas, conhecida como sistema renina-angiotensina. A renina, uma protease aspártica humana, catalisa a hidrólise do angiotensinogênio para produzir a angiotensina I, um decapeptídeo. Pela ação de outra enzima (enzima de conversão de angiotensina I – ECA I) sobre a angiotensina I, ocorre a liberação de um dipeptídeo e formação da angiotensina II, que é um octapeptídeo que estimula a produção de aldosterona, um hormônio que promove o aumento do volume do sangue devido à sua ação sobre o rim. Compostos que sejam capazes de inibir alguma das

enzimas envolvidas nesse processo são considerados bioativos anti-hipertensivos. Proteínas do leite, especialmente caseína, têm se mostrado importantes fontes de peptídeos que apresentam atividade inibitória da ECA I.

Estudos mostraram que a ação de pepsina, papaína e a combinação de papaína e tripsina geraram peptídeos com atividade anti-hipertensiva *in vitro*, após a hidrólise de proteínas da clara do ovo. Hidrolisado de albumina de soro bovino e de proteína de soja, obtidos pela ação de papaína, também mostraram ação inibitória de enzimas envolvidas no sistema renina-angiotensina.

Nos sistemas biológicos ocorrem naturalmente diversas reações oxidativas que fazem parte do metabolismo normal. Essas reações podem levar a um desequilíbrio conhecido como estresse oxidativo, devido à formação excessiva de espécies reativas de oxigênio (ERO). Essas espécies podem provocar danos a proteínas, ácidos nucleicos e ácidos graxos. Esses danos podem contribuir para o surgimento de doenças como câncer, cirrose e doenças coronarianas. Por isso, compostos que apresentem atividade antioxidante são benéficos à saúde e têm sido o foco de diversos estudos. Além disso, os consumidores têm dado preferência a conservantes naturais em detrimento de conservantes sintéticos. Estudos que visam à obtenção de compostos naturais com atividade antioxidante, que aumentem o tempo de conservação do alimento antes do consumo, têm grande importância para a indústria de alimentos.

Hidrolisados de peixe obtidos pela ação de bromelina e papaína apresentaram atividade antioxidante *in vitro*. Assim como hidrolisados de atum obtidos pela ação das enzimas pepsina e papaína apresentaram a presença de peptídeos com atividade antioxidante. Hidrolisados obtidos pela ação de papaína sobre gelatina e proteínas da clara de ovos também apresentaram atividade antioxidante. De forma geral, os estudos têm sido direcionados para a determinação das sequências de aminoácidos dos peptídeos que apresentam a atividade biológica para se compreender melhor seu mecanismo de ação.

O estresse oxidativo devido à formação excessiva de espécies reativas de oxigênio (ERO) pode contribuir para o surgimento de câncer, cirrose e doenças coronarianas. Peptídeos bioativos podem apresentar atividade antioxidante capaz de reduzir os riscos associados ao estresse oxidativo.

Peptídeos antioxidantes podem substituir aditivos sintético, conservando alimentos de forma mais natural.

► Síntese

A síntese de proteínas pode ser realizada de três formas distintas que podem ser empregadas em quantidade e escalas variadas: síntese química, síntese enzimática e síntese via DNA recombinante.

Síntese de plasteína – reação reversa à hidrólise que forma ligações peptídicas entre aminoácidos, seus ésteres ou peptídeos. É aplicada na incorporação de aminoácidos essenciais, na remoção do sabor amargo de pequenos peptídeos e no melhoramento das propriedades funcionais de proteínas.

Plasteína é o nome dado a moléculas semelhantes às proteínas naturais, cuja origem é a síntese catalisada por protease. No método enzimático, a formação da ligação peptídica é mediada por uma enzima em sua forma livre ou imobilizada. A reação pode ser realizada entre peptídeos e ésteres de aminoácidos ou via condensação entre segmentos peptídicos previamente preparados.

Como hidrolases, as proteases são capazes de realizar a reação inversa à hidrólise, em condições de baixa atividade de água no meio reacional (Figura 3.7). A síntese de plasteína é favorecida por alta concentração de substrato e pelo uso de solventes orgânicos, em meio reacional alcalino (pH de 9,0 a 10,0), o que torna os grupos amino mais favoráveis à formação de ligações, porém afeta pouco a atividade de algumas enzimas.

As principais enzimas usadas em síntese de plasteína são: termolisina, subtilisina, papaína, pepsina e tripsina.

As proteases mais estudadas para esse fim são as de origem microbiana: termolisina (*Bacillus thermoproteoliticus*) e subtilisina (*B. subtilis*); a de origem vegetal: papaína; e as de origem animal: pepsina e tripsina.

Síntese de aspartame

Aspartame é o nome comercial do adoçante de baixa caloria formado pelo dipeptídeo de ácido L-aspartico e pela

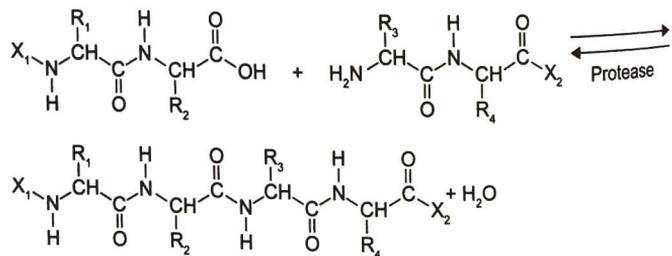


Figura 3.7 Síntese enzimática de proteína por inversão da hidrólise da ligação peptídica (X₁, X₂: cadeias peptídicas; R₁, R₂: cadeias laterais dos aminoácidos).

Síntese de aspartame –
 edulcorante não calórico
 formado pelo ácido L-aspártico
 e pela L-fenilalanina.
 A síntese enzimática
 garante a manutenção
 da estereoespecificidade
 necessária à formação do sabor
 doce.

L-fenilalanina esterificada por um grupo metil (L-asp-L-phe-OME) (Figura 3.8). Seu poder edulcorante é cerca de 200 vezes maior que o da sacarose e está diretamente relacionado com a configuração L dos aminoácidos envolvidos. O isômero do aspartame formado pelo ácido L-aspártico e D-fenilalanina apresenta sabor amargo, portanto, a manutenção da estereoespecificidade é fundamental para um bom rendimento de síntese.

Como a estereoespecificidade é necessária, a síntese enzimática, por meio de proteases, é superior à síntese química. As maiores produtoras mundiais de aspartame utilizam proteases imobilizadas de *Bacillus thermoproteolyticus* (termolisina) no processo de síntese. Essa enzima catalisa a formação do dipeptídeo pela ligação do ácido L-aspártico com o éster metílico da L-fenilalanina.

As reações de síntese podem ser aplicadas ainda na incorporação de aminoácidos essenciais a proteínas de baixo valor nutricional, na remoção de sabor amargo de peptídeos com aminoácido hidrofóbico C-terminal e na modificação de proteínas com o objetivo de melhorar propriedades funcionais.

Nesse último caso, um bom exemplo é a síntese de lipopeptídeos surfactantes pela reação da gelatina (colágeno desnaturado pelo calor), uma proteína altamente hidrofílica, com ésteres de leucina e ácidos graxos. Os ésteres podem ser ligados a frações de gelatina por síntese enzimática, gerando moléculas anfifílicas de alto poder emulsificante. Entretanto, o alto custo ainda restringe a viabilidade comercial desse produto.

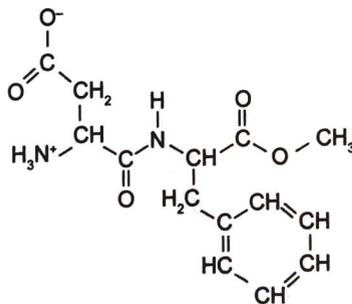


Figura 3.8 Molécula de aspartame.

Proteases com atividade de ligase vêm sendo utilizadas para formação de ligações peptídicas com melhor rendimento. A primeira enzima aplicada para esse fim foi a cisteína-protease bacteriana conhecida como sortase.

Tripsina e subtilisina foram alteradas para apresentar atividade de ligase, gerando a tripsiligase e a subtiligase.

Estudos têm sido realizados para identificar proteases que tenham características diferenciadas e que realizem reações de formação de ligações peptídicas em condições mais favoráveis e com melhor rendimento. Diversas proteases com atividades de ligase foram isoladas e testadas para esse fim. As primeiras enzimas desse tipo a serem estudadas foram a sortase e a butelase. A sortase A isolada de *Staphylococcus aureus* é uma cisteína-protease encontrada em diversas bactérias gram-positivas que tem a função biológica de ligar proteínas à peptídeo-glicana da parede dessas bactérias, podendo ser aplicada também para a ligação de peptídeos e proteínas entre si. Essa enzima está disponível comercialmente e vem sendo aplicada para obtenção de diversos produtos (*labelling* de proteínas e anticorpos, imobilização de proteínas e ciclização de peptídeos) através de sua atividade específica, denominada “sortagem” (*sortagging*). No entanto, o uso de sortases é muito limitado, uma vez que ela é absolutamente específica para a sequência aminoacídica LPXTG (leucina-prolina-x-treonina-glicina), hidrolisando a ligação envolvendo a glicina e fazendo uma nova ligação entre essa glicina e outra glicina. Uma alternativa já disponível é a butelase 1, isolada de plantas (especialmente *Crotalaria ternatea*, uma leguminosa ornamental). Essa enzima é uma cisteína-transpeptidase, que catalisa a ciclização de peptídeos para a biossíntese de ciclotídeos: toxinas vegetais com ação inseticida. Embora tenha especificidade bem mais ampla que a das sortases, butelases são obtidas de plantas, o que tende a aumentar seu custo. O conhecimento dessas enzimas permitiu a alteração de proteases existentes para a obtenção de proteases modificadas com alta especificidade para a reação reversa da hidrólise. A partir da tripsina foi desenvolvida a tripsiligase e a partir da subtilisina foram desenvolvidas a subtiligase, a peptiligase e a omniligase.

A tripsiligase é uma enzima que apresenta boa capacidade de formar ligações peptídicas de maneira seletiva, podendo atuar tanto na extremidade N-terminal quanto na C-terminal de proteínas ou peptídeos. Apresenta alta seletividade para o tripeptídeo YRH (tirosina-arginina-histidina), pois em sua forma nativa a enzima apresenta-se na

forma de zimogênio e é ativada exclusivamente na presença desse tripeptídeo e de íons Zn^{2+} . Dessa maneira, a reação de hidrólise é minimizada e a enzima apresenta excelente eficiência para a formação das ligações peptídicas.

► Reestruturação

Há um grande interesse no desenvolvimento de produtos cárneos, seus derivados e produtos à base de proteína vegetal. O desenvolvimento de produtos reestruturados promove melhora tecnológica na textura, na aparência, no aroma e no sabor dos produtos, e por isso permite agregar-lhes valor.

A transglutaminase (EC 2.3.2.13) é uma enzima que atua na síntese de ligações cruzadas entre moléculas de proteínas, gerando produtos chamados reestruturados. Essa enzima não é uma protease, mas foi incluída neste capítulo por sua ação sobre proteínas e seu grande potencial de aplicação em produtos proteicos.

As ligações cruzadas formadas pela transglutaminase são covalentes, bastante estáveis, intermoleculares e ocorrem entre resíduos dos aminoácidos glutamina e lisina, principalmente. Trata-se de uma reação de aciltransferase entre um resíduo de glutamina de uma cadeia peptídica com uma variedade de aminas primárias, sobretudo resíduos de lisina, de outra cadeia polipeptídica.

Os efeitos dessa reestruturação, juntamente com a sua capacidade de melhorar as propriedades físicas do alimento, aumentam consideravelmente o seu interesse tanto na esfera acadêmica quanto na industrial. Essa enzima, que é obtida de *Streptomyces mobaraensis* mas também já foi relatada como sendo produzida por outros microrganismos, como *Kutzneria albida*, tem sido aplicada com sucesso em tratamentos de alimentos de diferentes origens. O tratamento com transglutaminase parece favorecer aspectos sensoriais como: aroma, sabor, aparência e textura. Outros benefícios já relatados foram: aumento da vida de prateleira, absorção de minerais e redução dos efeitos alergênicos de certos alimentos. A transglutaminase traz efeitos benéficos ao processamento de produtos cárneos, mas também pode

A transglutaminase é uma enzima que atua na síntese de ligações cruzadas entre moléculas de proteínas, gerando produtos chamados reestruturados.

As ligações cruzadas formadas pela transglutaminase possibilitam a obtenção de produtos reestruturados, favorecendo diversos aspectos sensoriais: textura, aparência, aroma e sabor.

.....
 A proteômica pretende analisar todas as proteínas presentes em uma amostra, em dado momento. A complexa mistura de proteínas extraída deve ser separada e hidrolisada por proteases para permitir seu sequenciamento e posterior "remontagem". São utilizadas duas estratégias analíticas: baseada em gel, que separa as proteínas antes da hidrólise, e *shotgun*, que hidrolisa todas as proteínas juntas e separa os peptídeos gerados.

ser aplicada a produtos de pescados e em proteína vegetal. Recentemente o uso de transglutaminases vem sendo relatado para modificação de caseínas pouco gelificantes de leites de égua e camela.

Análise proteômica

A análise proteômica tem por objetivo a determinação da composição de complexos proteicos, sua caracterização e quantificação. A partir da composição torna-se possível o estudo das propriedades e funções das proteínas e peptídeos de uma amostra.

Normalmente, a amostra a ser analisada contém uma mistura complexa de proteínas, que são submetidas à hidrólise enzimática produzindo fragmentos posteriormente separados por nano-UPLC e analisados por espectrometria de massas (Figura 3.9).

A tripsina é a protease mais utilizada nesse processo para a hidrólise das proteínas em análise. Devido à sua alta especificidade, essa enzima gera peptídeos que apresentam arginina ou lisina na extremidade C-terminal, possibilitando a previsão dos pontos de clivagem e da composição original da proteína, utilizando-se bases de dados específicas para esse fim. Apesar de a tripsina ser eficiente e estar disponível no mercado a custo moderado, outras proteases têm sido estudadas para a aplicação em protocolos de proteômica, como quimotripsina e pepsina, além de associações de diferentes proteases, de modo a permitir a formação de peptídeos diferentes de uma mesma proteína, fornecendo maiores informações sobre sua estrutura original.

A utilização da análise proteômica em alimentos ainda é recente, por isso dados abrangentes ainda não estão disponíveis para a maior parte dos alimentos. Deve-se levar em consideração que a matriz de um alimento é bastante complexa e apresenta compostos de interação de proteínas com lipídeos ou carboidratos, entre outros. No entanto, essa metodologia poderá futuramente permitir a elucidação de mecanismos de reações observadas durante o processamento de alimentos proteicos, que ainda não são totalmente conhecidos.

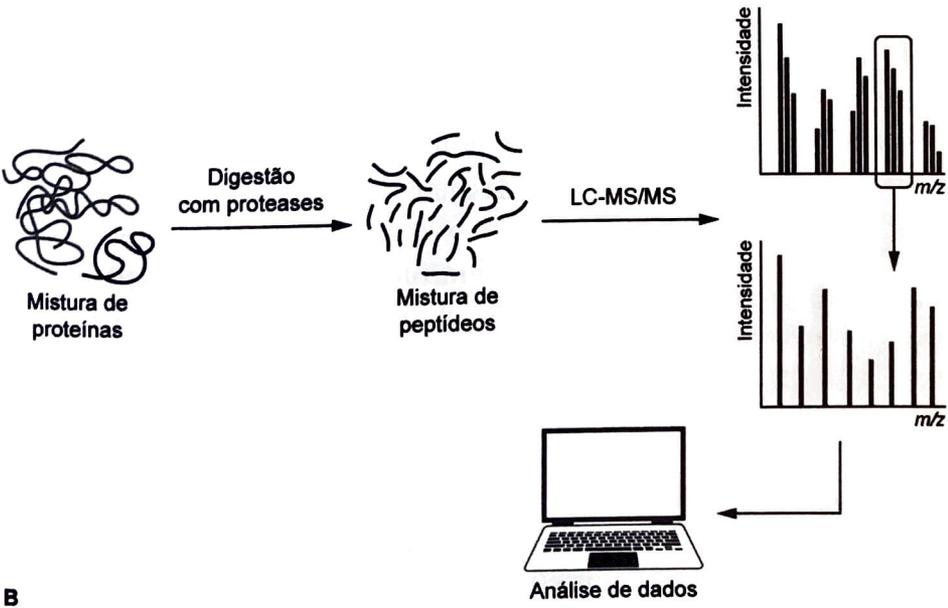
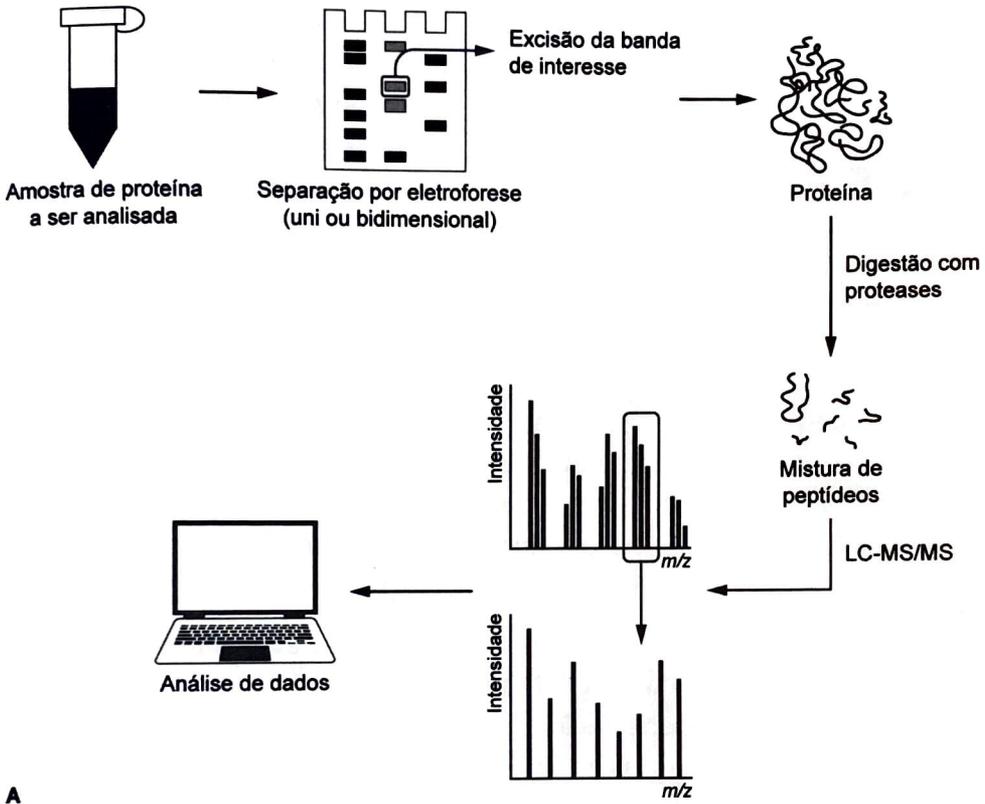


Figura 3.9 Representação das etapas de uma análise proteômica: baseada em gel (A) e por *shotgun* (B). LC-MS: cromatografia líquida-espectrometria de massa.

A proteômica pode ser utilizada para detectar adulterações em alimentos, pela identificação da presença de proteínas indicadoras de fraude.

A análise proteômica pode ser utilizada para a detecção de adulteração em alimentos, por exemplo, pela identificação da adição de leite bovino na produção de queijo de cabra ou ovelha, pela identificação da presença de fragmentos específicos da caseína bovina (caseínas γ_2 e γ_3); pela identificação da adição de proteína de soja em produtos à base de carne bovina ou soro de leite ou para a detecção do uso de alimentos geneticamente modificados, entre outras.

Métodos de detecção da atividade

A metodologia para detecção da atividade de proteases mais aplicada determina a formação de produtos de hidrólise (solúveis em TCA) por espectrofotometria a 280 nm.

A atividade proteolítica pode ser determinada sobre uma grande variedade de substratos: substrato natural (leite), substratos purificados (caseína, albumina, hemoglobina) ou sintéticos (arginina *p*-nitroanilida, azocaseína).

No caso do substrato natural, avalia-se a atividade pela medida do tempo entre a adição da enzima ao leite e a precipitação do coágulo. A maior parte das metodologias propostas utiliza caseína isolada como substrato e mede a formação de produtos de hidrólise (aminoácidos livres, como a tirosina, e peptídeos solúveis em solução de ácido tricloroacético) por espectrofotometria a 280 nm.

Os substratos sintéticos são geralmente cromogênicos ou fluorogênicos. Os cromogênicos apresentam um cromóforo cujo produto de hidrólise é facilmente mensurável pela alteração da intensidade da cor que é quantificada utilizando-se espectrofotometria. Os substratos fluorogênicos apresentam um fluoróforo (7-amino-4-metilcumarina, por exemplo) ligado a um peptídeo e, nessa forma, o composto apresenta pouca ou nenhuma fluorescência, mas emitirá alta fluorescência após a clivagem do peptídeo por uma protease. Dessa forma, a medida da fluorescência pode ser usada para quantificação da atividade da protease.

É importante notar que cada protease apresenta maior ou menor atividade de acordo com o substrato utilizado, com a temperatura e com o pH do ensaio, só sendo comparáveis resultados que levem em consideração todos esses fatores, além do tempo de reação e da agitação do meio reacional.