



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102018016168-7 A2



(22) Data do Depósito: 08/08/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 03/03/2020

(54) Título: PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE HIDROLISADOS DE CLARA DE OVO DE GALINHA DE CAPOEIRA DE MASSA MOLECULAR MENOR QUE 3 KDa COM ATIVIDADE ANTIDIABÉTICA, ANTI-HIPERTENSIVA E ANTIMICROBIANA

(51) Int. Cl.: C12P 21/06; C12N 1/14; C12R 1/66.

(71) Depositante(es): UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO; UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO.

(72) Inventor(es): ANNA CAROLINA DA SILVA; ALANA EMILIA SOARES DE FRANCA QUEIROZ; JOAO TIAGO CORREIA OLIVEIRA; TONY PICOLI; GEFERSON FISCHER; CRISTINA MARIA DE SOUZA MOTTA; ELIZABETE RODRIGUES DA SILVA; KEILA APARECIDA MOREIRA.

(57) Resumo: PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE HIDROLISADOS DE CLARA DE OVO DE GALINHA DE CAPOEIRA DE MASSA MOLECULAR MENOR QUE 3 kDa COM ATIVIDADE ANTIDIABÉTICA, ANTI-HIPERTENSIVA E ANTIMICROBIANA. Esta invenção descreve um método de obtenção de hidrolisados pré-putificados com atividades anti-hipertensiva, antidiabética e antimicrobiana da clara do ovo de galinha de capoeira. Empregando-se a protease produzida por *Aspergillus avencaeus* URM 6706 para a hidrólise da clara do ovo que transcorreu por 24 horas. Os hidrolisados foram ultrafiltrados para obter-se os de massa molecular menor que 3 kDa. A atividade anti-hipertensiva foi avaliada pela inibição da enzima conversora angiotensina, a antidiabética pela inibição das enzimas α -glicosidase e α -amilase e a antimicrobiana pela inibição de *Staphylococcus aureus* e Vírus da Diarreia Viral Bovina. Tendo a metodologia propiciado a obtenção de hidrolisados provenientes da clara do ovo de galinha de capoeira com alto potencial para todas atividades testadas.

“PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE HIDROLISADOS DE CLARA DE OVO DE GALINHA DE
CAPOEIRA DE MASSA MOLECULAR MENOR QUE 3 kDa COM ATIVIDADE
ANTIDIABÉTICA, ANTI-HIPERTENSIVA E ANTIMICROBIANA”

RELATÓRIO DESCRITIVO

Campo da Invenção

[001] Esta invenção está inserida na área de biotecnologia e estabelece o processo de obtenção de hidrolisados com atividades antidiabética, anti-hipertensiva, antiestafilocócica e inibidora do vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDv), liberados da clara de ovos de galinha de capoeira pela ação de proteases produzidas por *Aspergillus avenaceus* URM 6706. Estes hidrolisados podem ser usados industrialmente no campo de alimentos funcionais na prevenção de doenças crônicas como diabetes e hipertensão. Também, podem ser aplicados na medicina veterinária na prevenção de importantes doenças animais, como a mastite bovina e a diarreia viral bovina.

Antecedentes da Invenção

[002] Os peptídeos bioativos por serem compostos de alto valor nutricional, desempenhando diversas funções nos organismos, são explorados em diferentes setores da indústria. Atualmente, os peptídeos bioativos de origem alimentar são empregados como ingrediente alternativo natural, regulador chave do organismo agindo semelhante a drogas sintéticas.

[003] Assim, peptídeos bioativos podem ser definidos como fragmentos específicos de proteínas que possuem um efeito positivo sobre as funções ou condições corporais, podendo influenciar a saúde. É importante salientar que essas moléculas quando dentro da cadeia das proteínas precursoras, não possuem atividades biológicas sendo necessária à sua hidrólise para que haja a liberação dos peptídeos. Quando liberados, esses peptídeos podem apresentar mais de uma

atividade biológica, são os chamados peptídeos multifuncionais, tornando-se ainda mais interessante industrialmente.

[004] A obtenção dos peptídeos multifuncionais pode correr pela hidrólise proteica que pode ser realizada de diferentes formas, sendo as mais corriqueiras a hidrólise por enzimas digestivas, a hidrólise como consequência da fermentação e maturação dos alimentos e a hidrólise por proteases microbianas recuperadas e após processos fermentativos industriais. Destas, a terceira é a mais empregada e segura, uma vez que é possível controlar do processo hidrolítico pelas características e especificidade enzimáticas. Além disso, o tamanho do peptídeo influencia na sua atividade; sabe-se que quanto menor for a sua massa molecular maior as chances do mesmo apresentar atividades biológicas.

[005] Por sua vez, a fonte de proteína utilizada na obtenção dos peptídeos é de grande importância para atividade biológica obtida. Por exemplo, sabe-se que o ovo de galinha já desempenha algumas funções biológicas, como a antioxidante e antimicrobiana, porém funções que são prejudicadas após o tratamento térmico, sendo necessário o consumo do ovo *in natura* para que essas funções sejam aproveitadas pelo organismo consumidor. Portanto, a hidrólise da clara para a liberação de peptídeos multifuncionais viabilizaria o aproveitamento dessas propriedades de forma mais eficiente. O ovo tipo “capoeira” ainda atribui ao produto final uma maior qualidade nutritiva, pois devido à produção orgânica permite uma maior concentração de proteínas e vitaminas, e não possuem resíduos de antibióticos.

[006] Os documentos do estado da técnica no âmbito patentário fazem referência à obtenção de peptídeos bioativos e hidrolisados proteicos provenientes da clara de ovos de galinha de capoeira capazes de apresentar diversas atividades biológicas e demais funcionalidades, apresentando diferença quanto ao uso e aplicação da tecnologia descrita na presente invenção.

[007] No documento US20060280804A1 está descrita a metodologia de preparação de peptídeos bioativos a partir de clara de ovo submetido a tratamento enzimático, preferencialmente pepsina. Os peptídeos obtidos apresentam atividade

inibidora da enzima de conversão da angiotensina (atividade inibidora da ECA) *in vitro*, e ou atividade anti-hipertensiva em ratos, e ou atividade antioxidante. Podendo ser utilizados como substâncias terapêuticas, e ou como produtos alimentares funcionais, aditivos alimentares, ingredientes ou produtos farmacêuticos para o tratamento, e ou prevenção da hipertensão em todas as suas formas em seres humanos ou animais, e para o tratamento, e ou prevenção de qualquer desordem associada à hipertensão em seres humanos ou animais. Diferentemente, a presente invenção utilizou um *mix* de peptídeos (hidrolisado proteico) da clara de ovos de galinha de capoeira em solução, que foram separados em grupos que diferiram quanto à massa molecular. Além disso, a hidrólise da clara de ovo de galinha de capoeira foi realizada com diferente enzima – protease produzida por *A. avenaceus* URM 6706, e os hidrolisados proteicos obtidos foram testados *in vitro*, o que difere do trabalho inicialmente citado que testou atividade inibidora da ECA também *in vivo*.

[008] No documento KR20030003463A está descrito o processo de preparação do hidrolisado de proteína a partir da clara de ovo utilizando proteólise, que produz hidrolisados resistentes à ação da ECA ao inibi-la, possuindo atividade anti-hipertensiva. A protease utilizada é adicionada a clara em solução aquosa na quantidade de 0,1 a 5% e reage de 30 a 50 °C e um pH de 6 a 9 durante 4 a 48 horas. A hidrólise ocorreu pela ação de uma ou mais proteases selecionadas de micro-organismos: Protamex (derivado de *Bacillus*), MP (*Aspergillus melleus*), LP (*Aspergillus oryzae*), Flavourzyme (*Aspergillus oryzae*), neutrase, alcalase, *Bacillus licheniformis*, Promod 192 (derivado de *Aspergillus*). Por exemplo, a clara de ovo é dissolvida em água a 55 a 60 °C, resfriada e adicionada com 1% de Protamex a um pH de 7. Então a solução reage a 47 °C por 28 horas e é mantida a 90 °C por 15 minutos para inativar a enzima. Diferindo da presente invenção à protease utilizada na hidrólise na clara de ovo, que de apenas um micro-organismo (*Aspergillus avenaceus* URM 6706), além da forma de obtenção dos peptídeos, uma vez que a hidrólise ocorreu à 50 °C e pH 10,0, numa concentração enzimática de 1% por 24 horas. Posteriormente, os hidrolisados foram separados por massas moleculares por meio de ultrafiltração. Além disso, os hidrolisados de massa molecular menor que 3 kDa foram testados quanto sua

atividade anti-hipertensiva, anti-diabética, anti-estafilococica e inibidora do Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDv).

[009] A invenção relatada no documento US8354502B2, descreve a produção de produtos bioativos derivados de proteínas do leite, particularmente caseínas. Os peptídeos podem ser obtidos por meio de tratamento enzimático, preferencialmente pepsina, dando origem a peptídeos com atividade antimicrobiana (contra bactérias Gram-positivas e contra *Escherichia coli*) e ou atividade inibidora da enzima conversora de angiotensina *in vitro* e ou atividade anti-hipertensiva e ou atividade antioxidante. A hidrólise é realizada a pH 3,0 numa proporção enzima-substrato de 3,7/100 (p/p) e a 37 °C, entre 10 min a 24 horas, mas preferencialmente por menos de 30 min. A presente invenção difere da acima relatada pelas diferenças quanto à fonte dos hidrolisados e obtê-los: clara de ovo de galinha de capoeira, pH 10,0, concentração enzimática de 1%, 50 °C e 24 horas de hidrólise. Além disso, a protease empregada foi produzida por *Aspergillus avenaceus* URM 6706, os hidrolisados foram ultrafiltrados e apresentaram atividade inibidora de ECA, anti-diabética, antiestafilocócica e inibidora do BVDv.

[010] Descrita no documento BR 1020170177068, a invenção também traz um método de obtenção de hidrolisados de clara de ovo de capoeira. Embora a hidrólise também tenha sido realizada pela ação da protease produzida por *Aspergillus avenaceus* URM 6706, as principais diferenças encontram-se no tempo de hidrólise e na purificação dos hidrolisados. Na invenção citada, a hidrólise ocorreu por até 24 horas e durante este tempo, alíquotas foram retiradas e as atividades biológicas foram testadas para identificar qual o tempo de hidrólise com a maior atividade; enquanto que na invenção que está sendo reivindicada a hidrólise ocorreu por apenas 24 horas, pois quanto maior o tempo, menor seriam os fragmentos proteicos produzidos. Quanto à purificação, na invenção de número BR 1020170177068 os hidrolisados trabalhos foram utilizados em sua forma bruta, ou seja, sem passar nenhum processo de purificação; enquanto que na que se reivindica, os hidrolisados foram pré-purificados a fim de se obter aqueles com menor massa molecular (menor

que 3 kDa). Por fim, o documento BR 1020170177068 ainda retrata atividades antioxidantes diversas, apenas.

[11] Diante do apresentado no estado da técnica, não foram encontrados documentos revelando elementos da presente invenção e, portanto, a mesma apresenta novidade.

Descrição da Invenção

[012] A hidrólise da clara de ovo de galinha foi realizada pela aplicação da protease produzida por *Aspergillus avenaceus* URM 6706, fungo depositado na Micoteca URM – WFCC Nº 604, do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil. A protease foi produzida por fermentação submersa, sob agitação, em meio composto por preferencialmente 1,0% p/v de farinha de soja e glicose, incubada entre 26 e 30 °C por 72 horas.

[013] A protease foi purificada por precipitação proteica por ação do álcool, compreendendo o álcool etílico, em baixa temperatura e sob agitação. Seguida da cromatografia de troca iônica em que a fase móvel consistiu em tampão levemente alcalino e a eluição realizada com sal, preferencialmente o NaCl (de 0,1 a 1M).

[014] A clara de ovo de galinha de capoeira (20%) foi homogeneizada em tampão alcalino (80%) sob rotação suave. Essa solução foi hidrolisada por ação da protease produzida por *A. avenaceus* URM 6706, após sua purificação. A hidrólise ocorreu à 50 °C e pH 10,0 (temperatura e pH ótimos de atuação da enzima empregada) por 24 horas. Transcorridas às 24 horas, hidrólise enzimática foi interrompida pela fervura da mistura clara e enzima por tempo maior que 5 minutos e em seguida mantida à baixa temperatura. Os hidrolisados foram separados por massa molecular pela utilização de ultrafiltros para centrifuga com limite de massa molecular de 3 kDa, sendo avaliados aqueles de massa molecular menor que 3 KDa.

[015] O grau de hidrólise obtido foi determinado por meio da quantificação de grupos amino livres com 2,4,6-ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) (Adler-Nissen. J. Agric. Food Chem.27: 1256-1262, 1979).

Exemplo 1: Caracterização da protease produzida por *A. avenaceus* URM 6706

[016] A atividade proteásica foi realizada segundo método descrito por Leighton (Leighton et al. J. Mol. Biol. 76:103-122, 1973). A determinação do conteúdo de proteínas no extrato enzimático foi realizada pelo método de Bradford (Bradford. Anal. Biochem. 72: 248-254, 1976). A temperatura e pH ótimos da enzima pura produzida por *A. avenaceus* URM 6706 foram determinadas ao se realizar a atividade proteásica em diferentes temperaturas e pH compreendendo uma faixa de pH do ácido ao alcalino.

[017] Após a precipitação com etanol, o fator de purificação e o rendimento da protease ficou de 2,9 vezes e 79,5%; e a atividade proteásica específica aumentou para 2374,3 U mg⁻¹. Após a cromatografia de troca iônica, o fator de purificação aumentou para 16,82 vezes e o rendimento ficou em 40,0%.

[018] No perfil cromatográfico foi visto quatro diferentes picos de proteínas totais e quatro picos correspondentes as proteases. No maior pico de atividade enzimática também foi obtido o menor pico de proteínas totais; o que corresponde ao pico com melhores valores de purificação e rendimento.

[019] O pH ótimo da protease purificada produzida por *A. avenaceus* URM 6706 foi pH 10,0, e a enzima apresentou a menor atividade em pH ácido.

[020] A temperatura ótima da enzima purificada produzida por *A. avenaceus* URM 6706 foi 50 °C para atividade proteásica.

Exemplo 2: Caracterização dos hidrolisados da clara de ovo de galinha de capoeira obtidos pela hidrólise da protease produzida por *A. avenaceus* URM 6706 quanto às atividades biológicas de interesse para saúde humana

[021] A atividade anti-hipertensiva dos hidrolisados de proteínas da clara de ovo de galinha de capoeira foram avaliadas pela capacidade de inibir a hidrólise do N-Hippuril-L-histidil-L-leucina (HHL) pela ECA. A ECA (5 mU) foi incubada com a amostra de hidrolisados e com o HHL em tampão alcalino, recomendação 1 M, à 37 °C. O HCl 1M foi adicionado para interromper a reação, seguido da adição de acetato de etila, centrifugação a 3000 rpm (divisão em duas fases), e sobrenadante retirado e solvente evaporado. O resíduo resultante da evaporação foi ressuscitado e a atividade inibitória da ECA foi mensurada a 228 nm, preferencialmente (Cushman e Cheung. *Biochem. Pharmacol.* 20: 1637-1648, 1971).

[022] A atividade antidiabética dos hidrolisados foi avaliada pela inibição das enzimas α -glicosidase e α -amilase (Kim et al. *Carbohydr. Res.* 339:715-717, 2004). Para a α -glicosidase (10 U mL⁻¹), a reação com os hidrolisados ocorreu por volta de 37,5 °C por aproximadamente 30 minutos. Em seguida, p-nitro-fenil-glicopiranosídeo (pNPG a 10 mM, preferencialmente) foram adicionados à reação, que foi incubada novamente nas mesmas condições. A reação foi interrompida pela adição de Na₂CO₃.

[023] Para atividade de inibição da α -amilase (40 U mL⁻¹), os hidrolisados foram incubados por aproximadamente 15 minutos, de 36 a 38 °C. Em seguida, solução de amido foi acrescentada e a mistura reacional incubada por volta de 5 minutos na mesma temperatura. Após a incubação, os açúcares redutores liberados pela α -amilase foram dosados pelo ácido dinitrosalicílico (DNSA).

[024] Os hidrolisados da clara de ovo de galinha de capoeira com massa molecular menor que 3 kDa inibiram as enzimas ECA, α -glicosidase e α -amilase em 22,72; 57,58 e 94,36%, respectivamente.

Exemplo 3: Caracterização dos hidrolisados da clara de ovo de galinha de capoeira obtidos pela hidrólise da protease produzida por *A. avenaceus* URM 6706 quanto às atividades biológicas de interesse veterinário

[025] A atividade antiestafilocócica do hidrolisado da clara de ovo de galinha de capoeira foi realizada seguindo ensaio de microdiluição em caldo, conforme norma

M7-A6 do Clinical Laboratory Standards Institute (2003). O hidrolisado da clara de ovo de galinha de capoeira foi testado contra três isolados de *Staphylococcus aureus* de mastite bovina, na concentração de 50 mg mL⁻¹.

[026] A atividade antiviral dos hidrolisados (6,25 mg mL⁻¹) foi avaliada por meio da viabilidade de células de rim bovino em dois momentos: No primeiro momento, as células de rim bovino foram tratadas com os hidrolisados antes da infecção com o vírus, no segundo momento o tratamento ocorreu após a infecção. As avaliações de viabilidade celular foram realizadas segundo (Mosman. Jor. Immun. Meth. 65:55-63, 1983).

[027] A atividade antiestafilocócica exercida pelos hidrolisados da clara de ovo de galinha de capoeira variou de 55 a 88% de inibição de crescimento das três cepas testadas. A inibição do BVDv pelos hidrolisados foi de 56% para as células de rim bovino tratadas antes da infecção e de 82% para as células tratadas após a infecção.

[028] O método descrito na presente invenção possibilita a obtenção de hidrolisados obtidos da clara de ovo de galinha de capoeira, com atividades biológicas diversas: anti-hipertensiva, antidiabética, antiestafilocócica e antiviral, podendo ser aplicados na indústria farmacêutica na prevenção, controle e tratamento de doenças.

REIVINDICAÇÕES

1. “PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE HIDROLISADOS DE CLARA DE OVO DE GALINHA DE CAPOEIRA DE MASSA MOLECULAR MENOR QUE 3 kDa COM ATIVIDADE ANTIDIABÉTICA, ANTI-HIPERTENSIVA E ANTIMICROBIANA” **caracterizado por** consistir da produção e purificação de protease de *Aspergillus avenaceus* URM 6706, utilizando-a na hidrólise da clara de ovo de galinha de capoeira para obtenção de hidrolisados com atividades biológicas diversas como anti-hipertensiva, antidiabética, antiestafilocócica e antiviral.
2. “PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE HIDROLISADOS DE CLARA DE OVO DE GALINHA DE CAPOEIRA DE MASSA MOLECULAR MENOR QUE 3 kDa COM ATIVIDADE ANTIDIABÉTICA, ANTI-HIPERTENSIVA E ANTIMICROBIANA”, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** processo de hidrólise por 24 horas em temperatura e pH ótimos da protease produzida por *Avenaceus avenaceus* URM 6707, e obtenção de hidrolisados pré-purificados menores que 3 kDa.
3. “PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE HIDROLISADOS DE CLARA DE OVO DE GALINHA DE CAPOEIRA DE MASSA MOLECULAR MENOR QUE 3 kDa COM ATIVIDADE ANTIDIABÉTICA, ANTI-HIPERTENSIVA E ANTIMICROBIANA”, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pela** inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA), atividade anti-hipertensiva, pelos hidrolisados da clara de ovo de galinha de capoeira.
4. “PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE HIDROLISADOS DE CLARA DE OVO DE GALINHA DE CAPOEIRA DE MASSA MOLECULAR MENOR QUE 3 kDa COM ATIVIDADE ANTIDIABÉTICA, ANTI-HIPERTENSIVA E ANTIMICROBIANA”, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pela** inibição das enzimas α -glicosidase e α -amilase, atividade antidiabética, pelos hidrolisados da clara de ovo de galinha de capoeira.

5. “PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE HIDROLISADOS DE CLARA DE OVO DE GALINHA DE CAPOEIRA DE MASSA MOLECULAR MENOR QUE 3 kDa COM ATIVIDADE ANTIDIABÉTICA, ANTI-HIPERTENSIVA E ANTIMICROBIANA”, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pela** inibição do crescimento dos micro-organismos *Staphylococcus aureus* e Vírus da Diarreia Viral Bovina, pelos hidrolisados da clara de ovo de galinha de capoeira.

RESUMO

“PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE HIDROLISADOS DE CLARA DE OVO DE GALINHA DE CAPOEIRA DE MASSA MOLECULAR MENOR QUE 3 kDa COM ATIVIDADE ANTIDIABÉTICA, ANTI-HIPERTENSIVA E ANTIMICROBIANA”. Esta invenção descreve um método de obtenção de hidrolisados pré-putificados com atividades anti-hipertensiva, antidiabética e antimicrobiana da clara do ovo de galinha de capoeira. Empregando-se a protease produzida por *Aspergillus avencaeus* URM 6706 para a hidrólise da clara do ovo que transcorreu por 24 horas. Os hidrolisados foram ultrafiltrados para obter-se os de massa molecular menor que 3 kDa. A atividade anti-hipertensiva foi avaliada pela inibição da enzima conversora angiotensina, a antidiabética pela inibição das enzimas α -glicosidase e α -amilase e a antimicrobiana pela inibição de *Staphylococcus aureus* e Vírus da Diarreia Viral Bovina. Tendo a metodologia propiciado a obtenção de hidrolisados provenientes da clara do ovo de galinha de capoeira com alto potencial para todas atividades testadas.