

CENTRO UNIVERSITÁRIO FEI
VITOR STABILE GARCIA

**OBTENÇÃO DE EXTRATOS ENZIMÁTICOS ENRIQUECIDOS EM PROTEASES A
PARTIR DE FUNGOS ASSOCIADOS A CAULES E FOLHAS DE MANDIOCA
VISANDO A DIGESTÃO DO GLÚTEN**

São Bernardo do Campo

2019

VITOR STABILE GARCIA

**OBTENÇÃO DE EXTRATOS ENZIMÁTICOS ENRIQUECIDOS EM PROTEASES A
PARTIR DE FUNGOS ASSOCIADOS A CAULES E FOLHAS DE MANDIOCA
VISANDO A DIGESTÃO DO GLÚTEN**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Centro Universitário FEI para obtenção do
título de Mestre em Engenharia Química.
Orientado pela Prof^a. Dr^a. Andreia de
Araújo Morandim Giannetti.

São Bernardo do Campo

2019

Stabile Garcia, Vitor.

Obtenção de extratos enzimáticos enriquecidos em proteases a partir de fungos associados a caules e folhas de mandioca visando a digestão do glúten / Vitor Stabile Garcia. São Bernardo do Campo, 2019.

131 p. : il.

Dissertação - Centro Universitário FEI.

Orientadora: Prof.^a Dra. Andreia de Araújo Morandim Giannetti.

1. Glúten . 2. Proteases . 3. Fungos endofíticos. 4. Distúrbios alimentares . 5. Mandioca . I. de Araújo Morandim Giannetti, Andreia, orient. II. Título.

Aluno: Vitor Stabile Garcia

Matrícula: 417121-1

Título do Trabalho: Obtenção de extratos enzimáticos enriquecidos em proteases a partir de fungos associados a caules e folhas de mandioca visando a digestão do glúten.

Área de Concentração: Engenharia Química

Orientador: Prof^a Dr^a Andreia de Araújo Morandim Giannetti

Data da realização da defesa: 17/06/2019

ORIGINAL ASSINADA

Avaliação da Banca Examinadora:

São Bernardo do Campo, / / .

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Andreia de Araújo Morandim Giannetti Ass.: _____

Prof^a Dr^a Adriana Célia Lucarini Ass.: _____

Prof^a Dr^a Patrícia Alessandra Bersanetti Ass.: _____

A Banca Julgadora acima-assinada atribuiu ao aluno o seguinte resultado:

APROVADO

REPROVADO

VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO

**APROVO A VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO EM QUE
FORAM INCLUÍDAS AS RECOMENDAÇÕES DA BANCA
EXAMINADORA**

Aprovação do Coordenador do Programa de Pós-graduação

Prof. Dr. Ricardo Belchior Torres

Dedico este trabalho a todas as pessoas que sofrem com algum tipo de intolerância ao glúten. Que ele sirva de ponto inicial para a descoberta de terapias que possam melhorar a qualidade de vida dessas pessoas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Vitor Manoel Bello Garcia e Felippa Stabile Garcia, por sempre acreditarem em mim.

Agradeço às minhas irmãs, Karla Stabile Garcia e Katia Stabile Garcia, e também à minha sobrinha, Nathalia Garcia Scandiuzzi, por me apoiarem nas decisões da minha vida.

Agradeço à minha avó, Adela Bello Parga, por ser meu exemplo de vida.

Agradeço à minha noiva, Mayla Dornas, aos meus sogros, Saul Dornas e Edilamar Dornas, e também à minha cunhada, Evelyn Dornas, por todo o apoio durante esse projeto e por estarem ao meu lado em todas as etapas da minha vida.

Agradeço especialmente à minha orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Andreia de Araújo Morandim Giannetti, por todos os ensinamentos, direcionamento, apoio e ajuda para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço, também, à Prof^ª Dr^ª Adriana Célia Lucarini e à Prof^ª Dr^ª Patrícia Alessandra Bersanetti, pelas importantes considerações e conseqüentemente enriquecimento deste trabalho.

Agradeço a todos os funcionários da VEP ALIMENTOS, pela paciência durante esse período, o que possibilitou minha dedicação ao desenvolvimento desse trabalho.

Agradeço, por fim, a todos aqueles do laboratório de química da FEI, pela ajuda e suporte durante os ensaios desse trabalho.

RESUMO

O crescimento do número de pessoas que desenvolve alguma intolerância alimentar tem alertado pesquisadores de todo o mundo. Dentre elas, os distúrbios relacionados ao glúten se destacam, devido à imensa quantidade de produtos alimentícios que contém esse complexo proteico. Assim, diversos trabalhos estão sendo desenvolvidos na tentativa de buscar alternativas que minimizem os efeitos adversos decorrentes desses distúrbios. Resultados positivos têm sido obtidos através do enriquecimento de alimentos que contém glúten com proteínas específicas que têm a capacidade de hidrolisar sua cadeia proteica, bem como a ingestão direta destas. Nesse sentido, o presente trabalho procurou investigar um fungo produtor de proteases capazes de hidrolisar as proteínas presentes no trigo, mais especificamente a gliadina e a glutenina, responsáveis pela formação do complexo proteico denominado glúten. Para isso, o isolamento de fungos associados ao caule e às folhas da mandioca foi realizado, bem como a análise do genoma visando suas identificações. Em seguida, verificou-se a capacidade de produção de proteases desses fungos, sendo que sete dos mesmos mostraram potencial na produção dessa classe de enzimas (CA2, CA3, CA6, CA9, FO2, FO3 e, FO5). Paralelamente, realizou-se o isolamento das proteínas presentes na farinha de trigo: albumina, globulina, glutenina e gliadina, que foram submetidas à ação dos fungos previamente selecionados. Após o teste de atividade proteolítica, um dos sete fungos testados (CA6) apresentou melhores resultados, sendo capaz de hidrolisar as quatro frações da farinha de trigo. Para este, realizou-se testes onde verificou-se que o pH 3 foi o melhor tanto para realização do cultivo quanto para o desenvolvimento da reação. O tempo de reação ideal foi de 25 horas. Após a especificação desses parâmetros, a pré-purificação da enzima foi realizada, através do método de precipitação salina utilizando sulfato de amônio. Os melhores resultados para a atividade enzimática foram obtidos na concentração de 75% de saturação (57,503 mg aminoácidos.mg⁻¹ proteínas) e sobrenadante obtido após a saturação com 75% (81,693 mg aminoácidos.mg⁻¹ proteínas). Análises utilizando os inibidores E64, pepstatina, PMSF e, ortofenantrolina mostraram que o a protease envolvida na digestão do glúten foi

inibida pela pepstatina, o que evidencia que a enzima envolvida é uma aspartil protease.

Palavras-chave: Glúten. Enzimas. Proteases. Fungos endofíticos. Distúrbios alimentares. Mandioca.

ABSTRACT

The growing number of people who develop some type of food intolerance has worried researchers around the world. Among them, issues related to gluten are highlighted due to the huge amount of food products which contain this proteic complex. In this context, several studies have been developed to find alternatives that minimize the side effects of these disorders. Positive results have been obtained through the enrichment of foods which contain gluten with specific proteins with the capacity of hydrolyzing their proteic chains, as well as their direct ingestion. Therefore, this study aimed at investigating a fungus which produces proteases capable of hydrolyzing the proteins present in wheat, more specifically gliadin and glutenin, responsible for the formation of the proteic complex named gluten. For this purpose, the isolation of fungi associated with the stem and leaves of cassava was carried out, in addition to the analysis of the genome to identify each of them. Subsequently, the proteases production capacity of these fungi was tested, in which the seven of them with the best results (CA2, CA3, CA6, CA9, FO2, FO3, and FO5) were selected. Simultaneously, the isolation of the proteins present in wheat flour was performed: albumin, globulin, glutenin, and gliadin, which were subjected to the action of the previously selected fungi. After the proteolytic activity test, one of the seven fungi tested (CA6) presented better results, capable of hydrolyzing the four fractions of wheat flour. For this organism, tests were carried out to verify that pH 3 was the best for both cultivation and development of the reaction. The ideal reaction time was 25 hours. After the specification of these parameters, the pre-purification of the enzyme was performed by means of saline precipitation using ammonium sulfate. The best result for the enzymatic activity was obtained at 75% of saturation (57.503 mg of amino acids.mg⁻¹ proteins) and supernatant obtained after saturation with 75% (81.693 mg of amino acids.mg⁻¹ proteins). Analyses using the inhibitors E64, pepstatin, PMSF, and orthophenanthroline showed that the protease involved in the digestion of gluten was inhibited by pepstatin, which shows that the enzyme involved is an aspartyl protease.

Keywords: Gluten. Enzymes. Proteases. Endophytic fungi. Food disorders. Cassava.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Classificação taxonômica de alguns cereais.....	21
Figura 2 - Corte longitudinal da semente do trigo.....	22
Figura 3 - Formação da ligação dissulfeto a partir de duas moléculas de cisteína ...	27
Figura 4 - Ligação tirosina-tirosina e ácido ferúlico, glúten e arabinoxilanos.....	28
Figura 5 - Interações não covalentes presentes no glúten.....	28
Figura 6 - Regiões e ligações dissulfídicas na γ -gliadina	32
Figura 7 - Proposta de estrutura da glutenina na massa.....	35
Figura 8 - Classificação das desordens relacionadas ao glúten.....	36
Figura 9 - Mapeamento das regiões indutoras de desordem da α -gliadina.....	37
Figura 10 - Diferença entre as microvilosidades de um intestino saudável e de um afetado pela doença celíaca.....	38
Figura 11 - 20 aminoácidos principais.....	41
Figura 12 - Estruturas primária, secundária, terciária e quaternária das proteínas ...	42
Figura 13 - Principais enzimas utilizadas industrialmente	44
Figura 14 - Estrutura superficial da enzima proliloligopeptidase	47
Figura 15 - Quebra do peptídeo 3-mer da gliadina pela prolil oligopeptidase	48
Figura 16 - Porcentagem de fungos endofíticos isolados de cada filo de 2014 a 2017	50
Figura 17 - Maiores produtores de mandioca do mundo	52
Figura 18 - Produção global de mandioca (ha/km ²)	53
Figura 19 - Regiões produtoras de mandioca no Brasil	53
Figura 20 - Fluxograma para preparo do extrato enzimático bruto.....	60
Figura 21 - Fluxograma para determinar a atividade proteolítica dos extratos enzimáticos	62
Figura 22 - Estrutura química do Coomassie Brilhante Blue G-250.....	63
Figura 23 - Fluxograma para extração das frações proteicas da farinha de trigo.....	65
Figura 24 - Fluxograma de reação de hidrólise da gliadina e glutenina	66
Figura 25 - Reação da ninidrina com aminoácido	67
Figura 26 - Fluxograma de reação de hidrólise da farinha de trigo e suas frações ...	69
Figura 27 - Fluxograma para avaliação dos efeitos dos inibidores.....	74

Figura 28 - Colônias Impuras	76
Figura 29 - Fungos obtidos do caule da mandioca	76
Figura 30 - Fungos obtidos da folha da mandioca	77
Figura 31 - Halo formado pela presença de proteases	78
Figura 32 - Fungos crescidos em meio ágar-leite	79
Figura 33 - Atividade proteolítica dos fungos associados a mandioca	81
Figura 34 - Extração das frações proteicas da farinha de trigo	84
Figura 35 - Reação da ninidrina com o hidrolisado de gliadina e glutenina.	86
Figura 36 - Hidrólise das frações proteicas da farinha de trigo	87
Figura 37 - pH de cultivo do fungo CA6.....	88
Figura 38 - Hidrolisado proteico da farinha de trigo em função do tempo	90
Figura 39 - Tempo de hidrólise proteica da farinha de trigo	90
Figura 40 - Estudo do pH de hidrólise da farinha de trigo.	92
Figura 41 - Variação da hidrólise com o pH	92
Figura 42 - Atividade específica de cada precipitado	94
Figura 43 - Gel de eletroforese dos precipitados.....	95
Figura 44 - Gel de eletroforese dos hidrolisados proteicos	95
Figura 45 - Atividade enzimática frente a diferentes inibidores de proteases.....	97
Figura 46 - Exemplo de curva de calibração utilizada na dosagem proteica.....	121
Figura 47 - Curva da concentração de <i>L</i> -Leucina vs absorvância a 570 nm.....	122
Figura 48 - Atividade de protease por mL de extrato	123
Figura 49 - Dosagem proteica dos extratos enzimáticos obtidos	124

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Área de cultivo, produção e principais regiões produtoras dos cereais em 2016	20
Tabela 2 - Composição dos cereais	23
Tabela 3 - Composição dos aminoácidos (%-mol) em diversos cereais	25
Tabela 4 - Teor de compostos por 100g da farinha de trigo	27
Tabela 5 - Proteínas de armazenamento do trigo, centeio, cevada e aveia	31
Tabela 6 - Caracterização das proteínas da gliadina no trigo	33
Tabela 7 - Caracterização das proteínas da glutenina no trigo	34
Tabela 8 - Classe de enzimas e funções	43
Tabela 9 - Classificação das proteases	45
Tabela 10 - Alguns fungos endofíticos associados a diferentes plantas	51
Tabela 11 - Tampões utilizados para cada pH	69
Tabela 12 - Composição do meio	70
Tabela 13 - Enzimas presentes no padrão (LMW-SDS Marker Kit) utilizado	72
Tabela 14 - Etapas para revelação do gel através do método de Blum, Bier e Gross	73
Tabela 15 - Concentração de cada reagente	75
Tabela 16 - Resultado de genotipagem de cada amostra de fungo	77
Tabela 17 - Fungos produtores de protease	80
Tabela 18 - Relação de hidrólise de cada composto presente na farinha	87
Tabela 19 - Hidrólise da farinha de trigo pelos precipitados	93
Tabela 20 - Concentração de aminoácidos para cada inibição	97
Tabela 21 - Soluções utilizadas em uma das dosagens proteicas	121
Tabela 22 - Soluções aquosas padrão de <i>L</i> -leucina	122

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A - Dados referentes a dosagem proteica.....	121
APÊNDICE B - Dados referentes ao cálculo de hidrólise.....	122
APÊNDICE C - Dados de atividade por mL dos extratos	123
APÊNDICE D - Dados de dosagem proteica dos extratos enzimáticos	124
APÊNDICE E - Hidrólise das frações proteicas pelo fungo CA6	125
APÊNDICE F - pH de cultivo do fungo CA6	126
APÊNDICE G - Tempo de hidrólise da farinha de trigo	127
APÊNDICE H - pH ótimo de hidrólise da farinha de trigo	128
APÊNDICE I - Precipitação salina	129
APÊNDICE J - Concentração proteica dos precipitados	130
APÊNDICE K - Atividade específica dos precipitados.....	131

LISTA DE ABREVIÇÕES

PVPP	polivinilpirrolidona
SDS	dodecil sulfato de sódio
EDTA	tetrametiletilenodiamino
DTT	ditiotreitól
BDA	batata dextrose agar
UV/VIS	ultravioleta/visível
NaClO	hipoclorito de sódio
UV	ultravioleta
N ₂	Nitrogênio
E-64	trans-epoxisuccinil-L-leucilamido(4-guanidino)butano
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonila
Q	Glutamina
P	Prolina
F	Fenilalanina
Y	Tirosina
G	Glicina
S	Serina
G	Valina
APM	Alto Peso Molecular
MPM	Médio Peso Molecular
BPM	Baixo Peso Molecular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	18
2.1	OBJETIVO GERAL	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1	OS CEREAIS	19
3.1.1	Estrutura dos cereais	21
3.1.2	Proteínas dos cereais	23
3.1.2.1	<i>Proteínas do trigo</i>	25
3.1.2.1.1	<i>O glúten</i>	29
3.1.2.1.2	<i>Gliadina</i>	32
3.1.2.1.3	<i>Glutenina</i>	33
3.1.2.1.4	<i>Problemas relacionados ao glúten</i>	35
3.2	ENZIMAS	40
3.2.1	Proteases	43
3.2.1.1	<i>Proteases específicas para hidrólise do glúten</i>	47
3.3	FUNGOS ENDOFÍTICOS	49
3.4	MANDIOCA.....	51
3.4.1	Fungos endofíticos presentes na mandioca	54
4	MATERIAIS E MÉTODOS	55
4.1	MATERIAIS.....	55
4.2	EQUIPAMENTOS	56
4.3	METODOLOGIAS	57
4.3.1	Obtenção dos fungos a partir dos caules e folhas de mandioca	57
4.3.2	Purificação dos fungos	58
4.3.3	Identificação dos fungos	58
4.3.4	Preparo do extrato enzimático bruto	59
4.3.5	Análise qualitativa da produção de protease dos fungos isolados	60
4.3.6	Determinação quantitativa da atividade proteolítica dos extratos enzimáticos brutos	61
4.3.7	Dosagem proteica das amostras	63

4.3.8	Seleção dos fungos que mostraram maior atividade proteolítica.....	64
4.3.9	Extração das frações proteicas da farinha de trigo.....	64
4.3.10	Reação de hidrólise da gliadina e glutenina a partir dos extratos enzimáticos bruto selecionados	66
4.3.11	Hidrólise da farinha de trigo e de suas frações com o extrato enzimático CA6.....	68
4.3.12	Preparo do meio líquido para crescimento do fungo selecionado	69
4.3.13	Hidrólise da farinha de trigo com o fungo crescido em diferentes pHs	70
4.3.14	Determinação do tempo e pH ideais.....	71
4.3.15	Precipitação salina do extrato enzimático bruto	71
4.3.16	Eletroforese.....	72
4.3.17	Avaliação do efeito de inibidores na atividade enzimática.....	73
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	76
5.1	PURIFICAÇÃO DOS FUNGOS E IDENTIFICAÇÃO	76
5.2	ENSAIO QUALITATIVO DOS FUNGOS PRODUTORES DE PROTEASE ..	78
5.3	ENSAIO QUANTITATIVO DOS FUNGOS PRODUTORES DE PROTEASE	81
5.4	EXTRAÇÃO DAS FRAÇÕES PROTEICAS DA FARINHA DE TRIGO	83
5.5	HIDRÓLISE DAS FRAÇÕES PROTEICAS DA FARINHA DE TRIGO	85
5.6	PH OTIMO DE PRODUÇÃO DA PROTEASE DO FUNGO SELECIONADO	88
5.7	TEMPO DE HIDRÓLISE DA FARINHA DE TRIGO	89
5.8	PH DE HIDRÓLISE DA FARINHA DE TRIGO.....	91
5.9	PRÉ PURIFICAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO CA6.....	93
5.10	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA FRENTE A INIBIDORES	97
6	CONCLUSÕES	99
	REFERÊNCIAS.....	100
	APÊNDICE A - DADOS REFERENTES A DOSAGEM PROTEICA.....	121
	APÊNDICE B - DADOS REFERENTES AO CÁLCULO DE HIDRÓLISE....	122
	APÊNDICE C - DADOS DE ATIVIDADE POR ML DOS EXTRATOS.....	123
	APÊNDICE D - DADOS DE DOSAGEM PROTEICA DOS EXTRATOS	

ENZIMÁTICOS.....	124
APÊNDICE E - HIDRÓLISE DAS FRAÇÕES PROTEICAS PELO FUNGO CA6.....	125
APÊNDICE F - PH DE CULTIVO DO FUNGO CA6.....	126
APÊNDICE G - TEMPO DE HIDRÓLISE DA FARINHA DE TRIGO.....	127
APÊNDICE H - PH ÓTIMO DE HIDRÓLISE DA FARINHA DE TRIGO.....	128
APÊNDICE I - PRECIPITAÇÃO SALINA.....	129
APÊNDICE J - CONCENTRAÇÃO PROTEICA DOS PRECIPITADOS.....	130
APÊNDICE K - ATIVIDADE ESPECÍFICA DOS PRECIPITADOS.....	131

1 INTRODUÇÃO

O número de pessoas que apresenta algum tipo de intolerância alimentar tem crescido significativamente nos últimos anos. Dentre essas intolerâncias, destacam-se aquelas em que o indivíduo apresenta efeitos adversos quando ingere o glúten, complexo proteico presente no trigo, aveia, cevada, centeio e seus derivados. Os efeitos adversos mais comuns desse tipo específico de intolerância incluem: dores abdominais, diarreias, flatulência e distensão do abdômen (CARDOSO et al., 2019; HENGGELER; VERÍSSIMO; RAMOS, 2017).

Dessa forma, os estudos envolvendo essa questão também passaram a ter maior relevância no meio acadêmico, visando, principalmente, encontrar alternativas que minimizem os efeitos adversos relacionados a esse tipo de doença. Neste contexto, uma alternativa que vem se mostrando muito promissora é a incorporação de determinadas enzimas, como a prolil oligopeptidase específica de glutamina 2, nos alimentos que contém glúten ou, até mesmo, a ingestão direta dessas enzimas (HAGER et al., 2014).

Por conta disso, a busca por novas fontes de enzimas tem crescido substancialmente nos últimos anos, sendo que a classe das proteases é a que concentra maior interesse industrial e, dessa forma, é uma das mais estudadas.

Dentre esses estudos, alguns relacionam a obtenção de proteases a partir de fungos, como por exemplo o *Aspergillus niger*, presente nos caules e folhas da mandioca. Uma vez que a mandioca é uma das culturas de maior relevância no território brasileiro, a obtenção de biomoléculas a partir desse insumo se mostra uma alternativa altamente promissora (HAGER et al., 2014).

Dessa forma, a partir da relevância dos dados relatados, o desenvolvimento do presente trabalho se justifica, uma vez que o mesmo foca na obtenção de proteases envolvidas na quebra do glúten a partir de fungos presentes nos caules e folhas da mandioca, bem como sua pré purificação.

2 OBJETIVOS

Levando-se em consideração a realização de diversos estudos visando novas fontes de enzimas, o objetivo geral e os objetivos específicos do presente trabalho estão descritos nos itens 2.1 e 2.2.

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo geral a avaliação da produção de proteases por fungos associados a folhas e caules da mandioca, visando a digestão do glúten.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Levando-se em consideração o objetivo geral do trabalho, destacam-se como objetivos específicos:

- a) Isolamento dos fungos associados a folhas e caules da mandioca;
- b) Purificação dos fungos isolados;
- c) Avaliação da presença de proteases nos fungos isolados;
- d) Avaliação da digestão do glúten pelos extratos enzimáticos ricos em proteases obtidos a partir dos fungos isolados;
- e) Seleção dos fungos mais promissores na produção de proteases relacionadas com a digestão do glúten;
- f) Verificação do melhor pH de crescimento do fungo isolado para produção de extratos enzimáticos ricos em proteases necessárias para a digestão do glúten;
- g) Determinação do tempo e pH ideais para a digestão do glúten;
- h) Pré purificação do extrato enzimático selecionado;
- i) Determinação da classe de protease relacionada com a digestão do glúten através da realização de ensaios com inibidores.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O número de pessoas que sofre com algum tipo de intolerância alimentar tem crescido significativamente nos últimos anos, sendo que os distúrbios relacionados ao glúten ocupam papel de extrema importância nessa questão, graças à grande quantidade de alimentos que contém esse complexo e, também, devido aos efeitos adversos gerados pela ingestão do mesmo, como, por exemplo, dores abdominais, diarreias, flatulência e distensão do abdômen (CARDOSO et al., 2019; HENGGELER; VERÍSSIMO; RAMOS, 2017).

Dessa forma, com a intenção de auxiliar na diminuição da ocorrência desses efeitos, diversos estudos estão sendo desenvolvidos no sentido de buscar fontes de enzimas que possuam a capacidade de hidrolisar o glúten, principalmente àquelas pertencentes à classe das proteases. Tais estudos se mostram promissores, o que vem despertando o interesse por parte da indústria e dos pesquisadores acerca da descoberta de novas fontes dessas biomoléculas.

3.1 OS CEREAIS

Os cereais são um dos cultivos mais importantes do mundo, devido a sua importância como fonte de alimento e energia para a humanidade, destacando-se como os principais deles: trigo, milho, arroz, cevada, sorgo, painço, aveia e centeio (TOSI et al., 2018; FRAUENLOB et al., 2017; SHEWRY; HALFORD, 2002; CARDOSO et al., 2019; KOEHLER; WIESER, 2013).

Os cereais ocupam 60% de toda a área reservada para cultivo do planeta, com as culturas de milho, arroz e trigo, chegando a uma produção de 2,5 bilhões de toneladas por ano (KOEHLER; WIESER, 2013; TOSI et al., 2018; REEVES; THOMAS; RAMSAY, 2016), como demonstrado na Tabela 1, que auxilia no entendimento da dimensão da importância desses cereais, mostrando a extensão das áreas de cultivo, as quantidades produzidas, bem como as principais regiões produtoras para cada um para o ano de 2016.

Tabela 1 - Área de cultivo, produção e principais regiões produtoras dos cereais em 2016

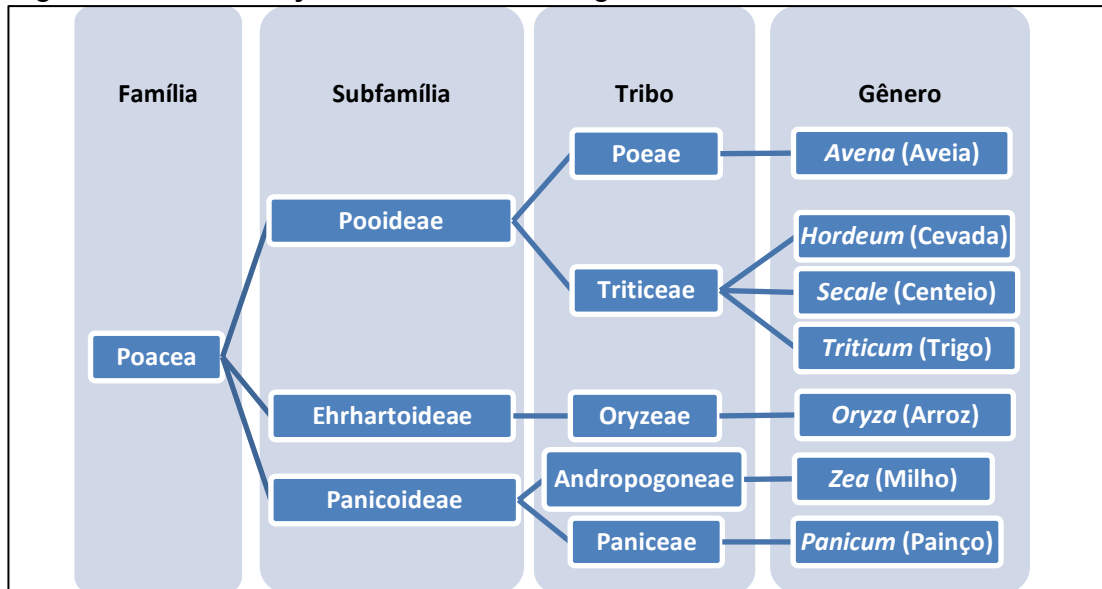
Espécie	Área de Cultivo (Milhões de Hectares)	Produção do Grão (Milhões de toneladas)	Principais Regiões Produtoras
Milho	195,3	1100	Estados Unidos
Arroz	165,2	756,1	China
Trigo	220,2	749	China
Cevada	47,6	145,7	Rússia
Sorgo	45,3	63,9	Estados Unidos
Painço	31,5	27,6	Índia
Aveia	9,5	23,6	Rússia
Centeio	4,4	13,3	Alemanha

Fonte: Autor “adaptado de” Faostat, 2016

As técnicas de cultivo para todos esses cereais são as mesmas, porém, o que difere são as condições climáticas ideais necessárias para o crescimento de cada um deles. Por exemplo: milho, arroz, sorgo e painço são cultivados em terras tropicais durante o ano e, na época livre de geadas, em áreas de clima temperado. Já o trigo, centeio, aveia, e a cevada são cultivados em climas moderados (KOEHLER; WIESER, 2013).

Estima-se um consumo de milhões de toneladas por dia desses cereais, o que representa 42,5% do suplemento calórico da dieta humana no mundo, sendo que o trigo consegue, sozinho, suprir 37% do fornecimento de proteínas em âmbito global, equiparando-se a produtos de alto índice proteico como peixe e carne bovina, o que reafirma sua relevância no cenário mundial (REEVES; THOMAS; RAMSAY, 2016). Conforme descrito por Morrison e Wrigley (2015), os cereais podem ser divididos genealogicamente levando-se em consideração a sua família, subfamília, tribo e o gênero e espécie, sendo esta divisão representada na Figura 1.

Figura 1 - Classificação taxonômica de alguns cereais



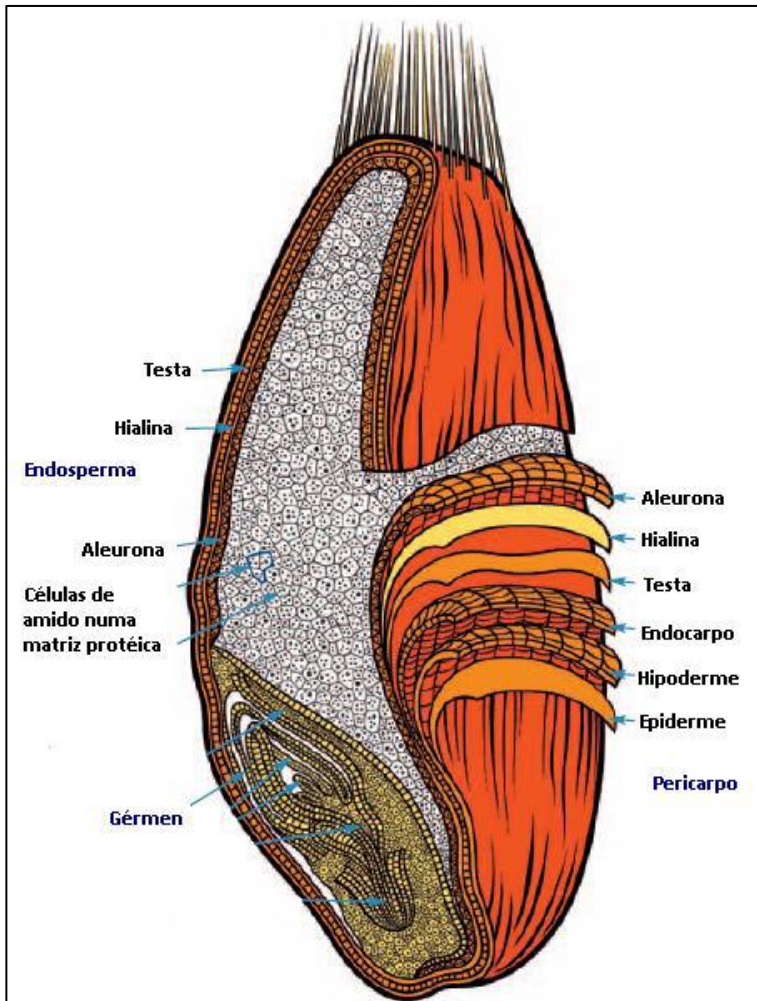
Fonte: Autor "adaptado de" Morrison e Wrigley, 2015

3.1.1 Estrutura dos cereais

Anatomicamente, os cereais possuem um pericarpo (casca) que envolve o endosperma e o gérmen. O endosperma representa de 70 a 80% do cereal e é constituído pelo endosperma amiláceo, fonte de amido, e da camada da aleurona, fonte de proteínas, gorduras, enzimas e vitaminas. O gérmen é fonte de lipídeos e enzimas e, o pericarpo, de fibras (celuloses e pentosanas) (Figura 2, Tabela 2) (REZAEI; NAJAFI; HADDADI, 2019; ZHANG et al., 2018; TOSI et al., 2018; BELITZ; GROSCH; SCHIEBERLE, 2009).

A camada do pericarpo tem a função de proteção, representando cerca de 17% do peso do grão no trigo. Essa camada pode ser dividida em: epiderme, hipoderme, endocarpo, testa, hialina e aleurona, sendo essa divisão em ordem do meio mais externo para o mais interno. O gérmen, por sua vez, é o embrião da semente e sua composição é rica em lipídeos, correspondendo de 2 a 3% do peso do grão (BELITZ; GROSCH; SCHIEBERLE, 2009).

Figura 2 - Corte longitudinal da semente do trigo



Fonte: Autor "adaptado de" Gwartz, Willyard e Mcfall, 2006

O endosperma amiláceo é a fonte de amido da semente e representa de 70 a 80% do peso do grão, aproximadamente. As células de amido estão acomodadas em uma matriz proteica que possui em sua composição quatro diferentes tipos de proteínas: as albuminas e globulinas, que são solúveis em soluções salinas, e as gliadinas e gluteninas, consideradas os principais componentes do glúten que, por sua vez, são insolúveis em soluções salinas (TOSI et al., 2018; VOJDANI; VOJDANI, 2017; ROSELL et al., 2014; GWIRTZ; WILLYARD; MCFALL, 2006).

Tabela 2 - Composição dos cereais

	Trigo	Centeio	Milho	Cevada	Aveia	Arroz	Painço
% em Peso							
Umidade	13,2	13,7	12,5	11,7	13,0	13,1	12,1
Proteína (Nx6,25)^a	11,7	9,5	9,2	10,6	12,6	7,4	10,6
Lipídeos	2,2	1,7	3,8	2,1	7,1	2,4	4,05
Carboidratos	59,6	60,7	64,2	63,3	55,7	74,1	68,8
Fibras	13,3	13,2	9,7	9,8	9,7	2,2	3,8
Minerais	1,5	1,9	1,3	2,25	2,85	1,2	1,6
mg/kg							
Tiamina	5,5	4,4	4,6	5,7	7,0	3,4	4,6
Niacina	63,6	15,0	26,6	64,5	17,8	54,1	48,4
Riboflavina	1,3	1,8	1,3	2,2	1,8	0,55	1,5
Ácido pantoténico (Vitamina B5)	13,6	7,7	5,9	7,3	14,5	7,0	12,5

Fonte: Autor "adaptado de" Belitz, Grosch e Schieberle, 2009

Notas: ^a Fator geral para conversão do Nitrogênio em Proteína, conforme Método de Kjeldahl.

3.1.2 Proteínas dos cereais

As proteínas dos cereais são estudadas há quase 250 anos e seu início se deu na tentativa de isolar o glúten do trigo (SHEWRY; HALFORD, 2002).

Os cereais possuem em sua composição cerca de 8% a 11% de proteínas, mas essa composição pode variar dependendo das condições de crescimento, genótipo e quantidade de nitrogênio fertilizante no solo (KOEHLER; WIESER, 2013).

Essas proteínas encontram-se distribuídas por todo o grão, porém, suas concentrações podem variar dependo da parte do cereal analisado (germe, camada da aleurona, endosperma amiláceo, e casca). O germe e a camada da aleurona possuem, cada um deles, 30% do total de proteínas presentes no grão, enquanto no endosperma amiláceo esse valor encontra-se próximo de 13% de proteínas, sendo ainda menor na casca, que possui apenas 7% do total de proteínas presentes no grão (BELITZ; GROSCH; SCHIEBERLE, 2009). Já o restante das proteínas encontram-se distribuídas pelas demais partes do grão.

Essas proteínas podem ser divididas, segundo Osborne (1907), de acordo com a sua solubilidade em determinadas substâncias (KOEHLER; WIESER, 2013):

- a) Albuminas: solúveis em água destilada;
- b) Globulinas: solúveis em soluções salinas diluídas;
- c) Gliadinas (prolaminas): solúveis em etanol aquoso 70%-80% (v/v) e propanol 50% (v/v) (SHOMER, et al., 1998; BELITZ; GROSCH; SCHIEBERLE, 2009);
- d) Gluteninas: solúveis em soluções ácidas e bases diluídas, sabões, e detergentes como o dodecil sulfato de sódio (SDS) (WRIGLEY; BEKES; BUSHUK, 2006) ou, também, em soluções alcoólicas com a adição do SDS em uma proporção de 1% (m/v) (LEON; ROSELL; BARBER, 2003).

As albuminas e as globulinas são proteínas metabólicas; já as gliadinas e a gluteninas são proteínas de armazenamento. Dentre essas duas últimas, as gliadinas são encontradas em diversos cereais, porém, com ligeira diferença na composição de aminoácidos e nomenclatura. Para o centeio, por exemplo, ela é chamada de secalina, para cevada, hordeína e, para a aveia, recebe o nome de avevina. No caso do trigo, utiliza-se o nome gliadina (HENGgeler; VERÍSSIMO; RAMOS, 2017; AUTRAN; HALFOR; SHEWRY, 2001; SDEPANIAN; MORAIS; FAGUNDES-NETO, 1999).

Na Tabela 3 é apresentada uma relação da composição de aminoácidos (%-mol) do total de proteínas dos cereais (KOEHLER; WIESER, 2013; WIESER et al., 1983), sendo possível verificar que os principais aminoácidos presentes no trigo são: glutamina (31,1%), prolina (12,6%), leucina (6,8%) e serina (6,6%).

Tabela 3 - Composição dos aminoácidos (%-mol) em diversos cereais

Aminoácido	Trigo	Centeio	Cevada	Aveia	Arroz	Painço	Milho
Asparagina e Aspartato	4,2	6,9	4,9	8,1	8,8	7,7	5,9
Treonina	3,2	4,0	3,8	3,9	4,1	4,5	3,7
Serina	6,6	6,4	6,0	6,6	6,8	6,6	6,4
Glutamina e Glutamato	31,1	23,6	24,8	19,5	15,4	17,1	17,7
Prolina	12,6	12,2	14,3	6,2	5,2	7,5	10,8
Glicina	6,1	7,0	6,0	8,2	7,8	5,7	4,9
Alanina	4,3	6,0	5,1	6,7	8,1	11,2	11,1
Cisteína	1,8	1,6	1,5	2,6	1,6	1,2	1,6
Valina	4,9	5,5	6,1	6,2	6,7	6,7	5,0
Metionina	1,4	1,3	1,6	1,7	2,6	2,9	1,8
Isoleucina	3,8	3,6	3,7	4,0	4,2	3,9	3,6
Leucina	6,8	6,6	6,8	7,6	8,1	9,6	14,1
Tirosina	2,3	2,2	2,7	2,8	3,8	2,7	3,1
Fenilalanina	3,8	3,9	4,3	4,4	4,1	4,0	4,0
Histidina	1,8	1,9	1,8	2,0	2,2	2,1	2,2
Lisina	1,8	3,1	2,6	3,3	3,3	2,5	1,4
Arginina	2,8	3,7	3,3	5,4	6,4	3,1	2,4
Triptofano	0,7	0,5	0,7	0,8	0,8	1,0	0,2
Grupo Amida	31,0	24,4	26,1	19,2	15,7	22,8	19,8

Fonte: Autor "adaptado de" Wieser et al., 1983

3.1.2.1 Proteínas do trigo

O trigo, principalmente o da espécie *Triticum aestivum* L., é considerado uma das principais fontes de energia e nutrientes na alimentação humana, juntamente com o arroz e o milho. Esse cereal tem sido utilizado como base alimentar desde as primeiras civilizações, tendo seu cultivo presente desde a antiguidade até os dias atuais (GONG et al., 2019; LEE; KOO, 2019; RIBEIRO et al., 2018; TOSI et al., 2018).

O trigo é o insumo básico utilizado para o preparo de pães, macarrão e diversos outros produtos, o que o coloca como um dos cereais mais consumidos no mundo todo. Estima-se que o seu cultivo ocupe aproximadamente 220 milhões de hectares, justificando sua produção de mais de 700 milhões de toneladas por ano. O elevado uso da espécie *Triticum aestivum* L. perante as demais se deve, principalmente, ao elevado teor de proteínas presentes nesta, fator amplamente avaliado pela indústria, uma vez que, quanto maior o teor de certos tipos de proteína no grão, melhores são os derivados obtidos a partir dele (GONG et al., 2019; LEE; KOO, 2019; RIBEIRO et al., 2018; TOSI et al., 2018).

Essas proteínas (aproximadamente 100 diferentes tipos, de alta e baixa massa molecular), especialmente a gliadina e glutenina, no caso do trigo, também apresentam função de fonte de aminoácidos para a planta em desenvolvimento, na etapa de germinação da mesma e, devido a insolubilidade dessas proteínas em água, a umidade desencadeada pela germinação do trigo faz com que essa reserva proteica não seja perdida (HENGgeler; VERÍSSIMO; RAMOS, 2017; VOJDANI; VOJDANI, 2017; WRIGLEY; BEKES; BUSHUK, 2006).

Além das proteínas, o trigo também possui em sua composição outros componentes como: água, gorduras, amido e vários compostos bioativos, conforme descrito na Tabela 4 (ZHANG et al., 2018; BENDER, 2003).

Destes componentes, as proteínas de armazenamento do trigo são, em sua maioria, como citado anteriormente, compostas por glutamina (cerca de 30%) e prolina (cerca de 13%). Observa-se que as proteínas do trigo possuem poucos resíduos de aminoácidos carregados, tanto positivamente (arginina, histidina e lisina) quanto negativamente (ácido aspártico e ácido glutâmico). Dessa forma, a repulsão de cargas entre as moléculas é baixa, facilitando as interações intermoleculares e intramoleculares (STAUFFER, 2007).

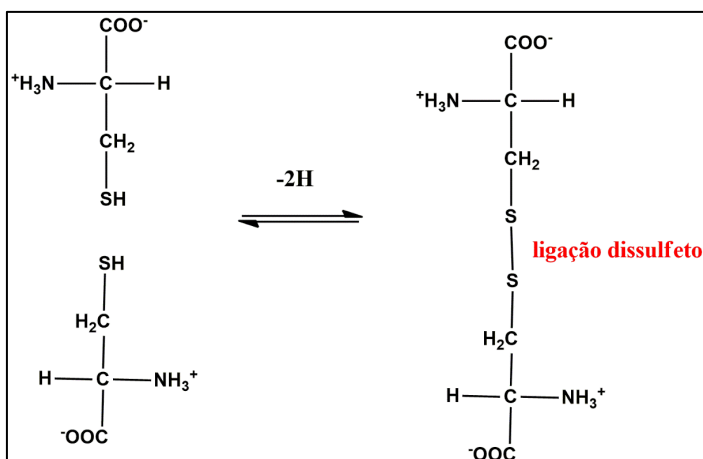
Outro fator determinante para a ocorrência de ligações intermoleculares e intramoleculares se dá pelo fato de que, dentre os aminoácidos do glúten, encontrar-se a cisteína, que, apesar de representar apenas 2% do total de aminoácidos, desempenha um papel fundamental devido à presença do grupamento tiol em sua cadeia lateral. Dessa forma, dois resíduos de cisteína podem interagir formando ligações covalentes dissulfeto, garantindo maior estabilidade da conformação terciária da proteína. Essas ligações ocorrem durante a maturação do grão, moagem, preparação da massa e cozimento (WIESER, 2007) (Figura 3).

Tabela 4 - Teor de compostos por 100g da farinha de trigo

Categoria	Compostos	Teor
Composição Geral	Água	12,1 g
	Proteínas	13,2–18,4 g
	Gorduras	3,5–3,9 g
	Amido	13,8–24,9 g
	Cinzas	3,4–8,1 g
	Outros	43,20 g
Compostos Biativos	Ácido Fítico	2180–5220 mg
	Ácido Ferúlico	500–1500 mg
	Alquilresorcinóis	220–400 mg
	Tocoferóis (Vitamina E)	1,4 mg
	Betaína	1000–1300 mg
	Colina	47–100 mg
	Niacina	14–18 mg
	Ácido Pantotênico (Vitamina B ₅)	2,2–3,9 mg
	Riboflavina (Vitamina B ₂)	0,39–0,75 mg
	Biotina (Vitamina B ₇)	0,048 mg
	Tiamina (Vitamina B ₁)	0,54 mg
	Piridoxina (Vitamina B ₆)	1–1,3 mg
	Folato	79–200 mg
	Luteína	97–140 mg
	Ferro	11 mg
	Manganês	12 mg
Zinco	7,3 mg	
Selênio	78 mg	

Fonte: Autor “adaptado de” Zhang et al., 2018

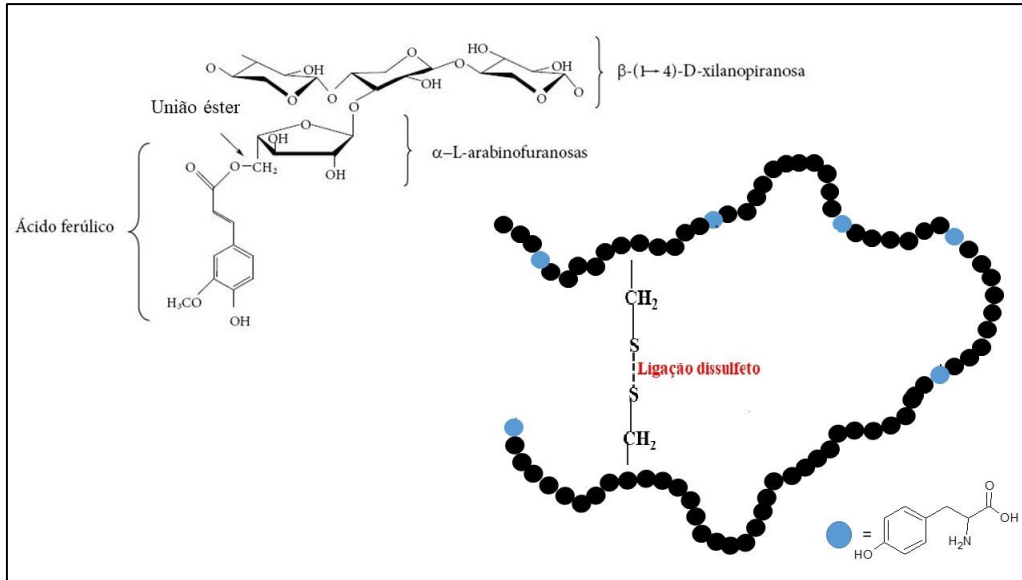
Figura 3 - Formação da ligação dissulfeto a partir de duas moléculas de cisteína



Fonte: Autor “adaptado de” Devlin, 1997

Outras ligações covalentes também são formadas como, por exemplo, as ligações cruzadas tirosina-tirosina entre proteínas do glúten e, também, as ligações cruzadas tirosina-ácido ferúlico entre proteínas do glúten e arabinoxilanos (Figura 4).

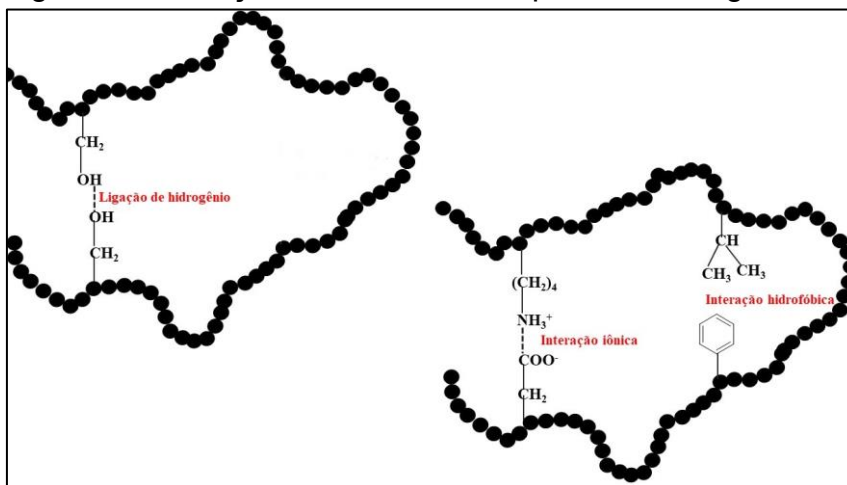
Figura 4 - Ligação tirosina-tirosina e ácido ferúlico, glúten e arabinoxilanos



Fonte: Autor "adaptado de" Morales-Ortega et al., 2013

As ligações não covalentes do glúten do trigo são representadas por ligações de hidrogênio, ligações iônicas e interações hidrofóbicas, essas menos energéticas que as ligações covalentes (WIESER, 2007) (Figura 5).

Figura 5 - Interações não covalentes presentes no glúten



Fonte: Autor

A presença de ligações de hidrogênio no glúten é confirmada a partir da adição de ureia, que ocasiona a quebra dessas interações entre as moléculas da proteína, desnaturação da mesma e conseqüente enfraquecimento da massa, ou diminuição da sua elasticidade. As ligações iônicas possuem um efeito fortalecedor, como íons bipolares de aminoácidos. As interações hidrofóbicas estabelecem a estabilidade da estrutura do glúten, e a energia da ligação aumenta com o aumento da temperatura, promovendo maior estabilidade ao realizar o processo de cozimento da massa (WIESER, 2007).

3.1.2.1.1 O glúten

Glúten, principal complexo proteico de armazenamento em cereais como trigo, cevada e centeio, é o termo utilizado para descrever as prolaminas e gluteninas presentes nesse tipo de material (KERPES; FISCHER; BECKER, 2017; ROSELL et al., 2014; WRIGLEY; BEKES; BUSHUK, 2006). O glúten foi isolado na sua forma pura pela primeira vez em 1728 por Beccari de Bolonha, que utilizou o método de lavagem com água, muito antes do glúten sequer ser considerado uma proteína (GWIRTZ; WILLYARD; MCFALL, 2006).

O glúten é essencial para o desenvolvimento do grão de trigo, mas também é considerado um composto de extrema relevância para a indústria alimentícia, com destaque para a panificação. Isso se deve às suas propriedades físicas essenciais, das quais podem-se destacar a extensibilidade (maciez) e elasticidade (firmeza), bem como a capacidade de adsorção de água, coesão e viscosidade, podendo ser utilizado como aditivo em alimentos processados para promover textura e retenção de umidade como, por exemplo, em sorvetes, manteiga, doces e molhos (LYNCH; COFFEY; ARENDT, 2018; BIESIEKIERSKI, 2017; HENGGELER; VERÍSSIMO; RAMOS, 2017; MANDARINO, 1994).

Das propriedades físicas essenciais do glúten, a extensibilidade e a elasticidade possuem grande destaque dentre as demais.

Durante o processamento da massa, quando água é adicionada à farinha de trigo e ocorre a aplicação de energia mecânica pela misturadora resultando na hidratação das proteínas do glúten, é formada uma rede proteica coesa e visco elástica, responsável por promover o aprisionamento do dióxido de carbono durante

a fermentação do pão, o que proporciona melhores características estruturais para o produto (HENGgeler; VERÍSSIMO; RAMOS, 2017; GOESAERT et al., 2005).

O glúten é composto por gliadinas e gluteninas (proteínas de armazenamento), que podem ser divididas de acordo com suas massas moleculares, ou seja, através da sua mobilidade em gel de poliacrilamida em:

- a) Alto Peso Molecular (APM);
- b) Médio Peso Molecular (MPM);
- c) Baixo Peso Molecular (BPM).

No glúten, o grupo de alto peso molecular é constituído por subunidades de glutenina, sendo que essas proteínas possuem de 600 a 800 resíduos de aminoácidos, massa molecular entre 70000 e 90000 Daltons, e grandes quantidades de glutamina, glicina e prolina em sua composição (KOEHLER; WIESER, 2013).

O grupo de média massa molecular é constituído por subunidades de ω 1,2-gliadina (trigo), ω 5-gliadina (trigo), ω -secalina (centeio) e, C-Hordeína (cevada), contendo de 300 a 400 resíduos de aminoácidos e massa molecular de aproximadamente 40000 Da, sendo que o grupo ω 5-gliadina possui mais de 400 resíduos de aminoácidos e massa molecular próxima de 50000 Da (KOEHLER; WIESER, 2013; STOVEN; MURRAY, MARIETTA, 2012).

Por último, o grupo de baixa massa molecular é constituído por grupos monoméricos de α/β -gliadina (trigo), γ -gliadina (trigo), γ -40k-secalina (centeio), γ -hordeína (cevada) e avenina (aveia). Observa-se a presença de grupos agregativos BPM-GS (trigo), γ -75k-secalina (centeio) e B-hordeína (cevada), que possuem 300 resíduos de aminoácidos e massa molecular média de 28000 a 35000 Da, diferente da γ -75k-secalina e da avenina, que possuem, respectivamente, aproximadamente 430 e 200 resíduos de aminoácidos e massa molecular média de 50000 e 2300 Da (KOEHLER; WIESER, 2013; GROSH; WIESER, 1999).

A Tabela 5 mostra a caracterização das proteínas de armazenamento do trigo, centeio, cevada e aveia no intuito de se ter uma comparação da composição desses três principais cereais. (WIESER; KOEHLER, 2008).

Tabela 5 - Proteínas de armazenamento do trigo, centeio, cevada e aveia

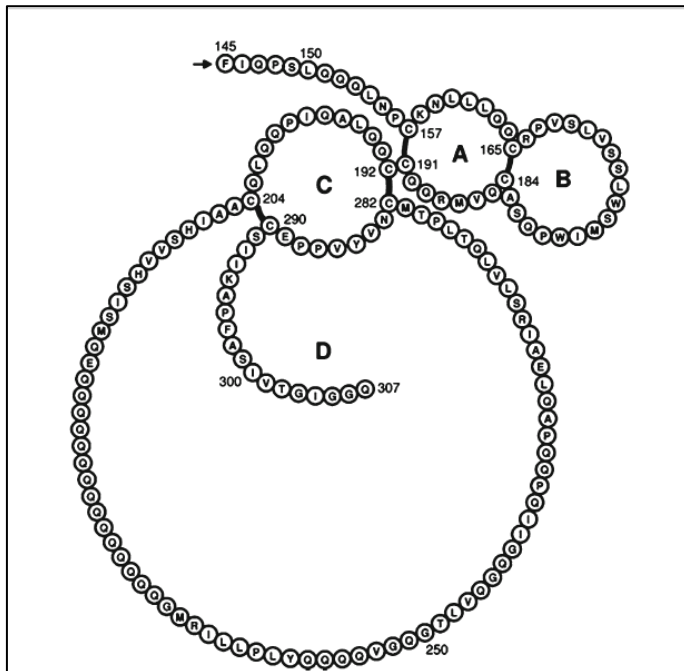
Grupo/Tipo	Código	Resíduos de amino ácidos	Estado	Unidade de repetição (frequência)	Composição Parcial dos aminoácidos (%mols)			
					Q	P	F+Y	G
Grupo APM								
APM-GS x	Q6R2V1	815	Agregado	QQPGQG(72x)	36	13	5,8	20
APM-GS y	Q52JL3	637	Agregado	QQPGQG(50x)	32	11	5,5	18
APM-secalina x	Q94IK6	760	Agregado	QQPGQG(66x)	34	15	6,7	20
APM-secalina y	Q94IL4	716	Agregado	QQPGQG(60x)	34	12	5,0	18
D-Hordeína	Q40054	686	Agregado	QQPGQG(26x)	26	11	5,5	16
Grupo MPM								
ω 5-gliadina	Q402I5	420	Monomérico	(Q)QQQFP(65x)	53	20	10,0	0,7
ω 1,2-gliadina	Q6DLC7	373	Monomérico	(QP)QQPFP(42x)	42	29	9,9	0,8
ω -secalina	O04365	338	Monomérico	(Q)QPQQPFP(32x)	40	29	8,6	0,6
C-Hordeína	Q40055	327	Monomérico	(Q)QPQQPFP(36x)	37	29	9,4	0,6
Grupo BPM								
α/β -gliadina	Q9M4M5	273	Monomérico	QPQPFPQPYP(5x)	36	15	7,4	26
γ -gliadina	Q94G91	308	Monomérico	(Q)QPQQPFP(15x)	36	18	5,2	2,9
BPM-GS	Q52NZ4	282	Agregado	(Q)QQPPFS(11x)	32	13	5,7	3,2
γ -40k-secalina	Q41320	-	Monomérico	QPQQPFP	-	-	-	-
γ -75k-secalina	Q9FR41	436	Agregado	QQPQQPFP(32x)	38	22	6,1	1,6
γ -hordeína	P17990	286	Monomérico	QPQQPFP(15x)	28	17	7,7	3,1
B-hordeína	P06470	274	Agregado	QQPFPQ(13x)	30	19	7,3	2,0
Avenina	Q09072	203	Monomérico	PFVQQQQ(3x)	33	11	8,4	2,0

Fonte: Wieser e Koehler, 2008

Notas: Q = Glutamina, P = Prolina, F = Fenilalanina, Y = Tirosina, G = Glicina, S = Serina, G = Valina, APM = Alto Peso Molecular, MPM = Médio Peso Molecular, BPM = Baixo Peso Molecular

A cisteína é responsável pelas ligações dissulfeto no glúten e a mesma ocorre através dos grupos sulfidril (SH), formando ligações entre elas mesmas ou entre outras proteínas. Na Figura 6 é mostrado um exemplo da estrutura C-terminal da γ -gliadina, com as ligações dissulfeto intramoleculares das seções III-V (STOVEN; MURRAY, MARIETTA, 2012; GROSH; WIESER, 1999; MULLER; WIESER, 1997).

Figura 6 - Regiões e ligações dissulfídicas na γ -gliadina



Fonte: Muller e Wieser, 1997

Dentre as principais proteínas do glúten destacam-se a gliadina e a glutenina.

3.1.2.1.2 Gliadina

A gliadina possui cadeias simples (monoméricas) e massa molecular variando de 30000 Da a 80000 Da (GOESAERT et al., 2005).

Ao realizar um gel de eletroforese, a gliadina pode ser separada em 4 grupos, levando-se em consideração a mobilidade no gel: α -, β -, γ - e ω -gliadina, sendo essa ordem decrescente de acordo com a mobilidade. Os grupos α e β são semelhantes, por isso são chamados de grupos α ou α/β . Outra classificação utilizada é com relação à quantidade de enxofre presente: Os grupos α/β e γ são classificados em prolaminas ricas em enxofre, enquanto o grupo ω em prolaminas pobres em enxofre (VOJDANI; VOJDANI, 2017; SHEWRY; HALFORD; TATHAM, 2003).

Métodos modernos, como Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), possibilitam separar as gliadinas em mais de 100 componentes. Baseado na análise da composição dos aminoácidos, na sua massa molecular e na sequência de aminoácidos, as gliadinas podem ser separadas em 4 diferentes grupos de acordo com a Tabela 6 (KOEHLER; WIESER, 2013):

Tabela 6 - Caracterização das proteínas da gliadina no trigo

Tipo	Peso Molecular (kDa)	% em relação ao total de proteínas do glúten	Resíduos de cisteína	Composição Parcial dos aminoácidos (%mols)				
				Q	P	F	Y	G
ω 5-gliadina	49-55	3-6	-	56	20	9	1	1
ω 1,2-gliadina	39-44	4-7	-	44	26	8	1	1
α/β -gliadina	28-35	28-33	6	37	16	4	3	2
γ -gliadina	31-35	23-31	8	35	17	5	1	3

Fonte: Autor "adaptado de" Koehler e Wieser, 2013

Nota: Q = Glutamina, P = Prolina, F = Fenilalanina, Y =Tirosina, G = Glicina

Os grupos α/β e γ apresentam uma maior quantidade em relação às proteínas do glúten do que o grupo ω . A quantidade de glutamina e prolina é maior em comparação com outros aminoácidos, seja nos grupos α/β , γ ou ω . Os grupos ω não possuem ligações dissulfídicas. Os grupos α/β possuem 6 resíduos de cisteína e o grupo γ possui 8 resíduos de cisteína, o que favorece a formação de ligações dissulfeto intramolecular (VOJDANI; VOJDANI, 2017; WIESER, 2007).

As ligações dissulfídicas que ocorrem nas cadeias proteicas da gliadina são todas intramoleculares, sendo assim classificadas como proteínas monoméricas de cadeia simples (sem ligações transversais entre as cadeias proteicas). Estudos mostram que os domínios C-terminal dos grupos α/β e γ -gliadinas são estruturas α -hélice e folhas- β (WIESER, 2007).

No preparo da massa em produtos de panificação, a gliadinas, ao serem hidratadas, contribuem para a extensibilidade da massa, diferentemente das gluteninas, que contribuem com a sua elasticidade e força. Isso resulta na importância do balanço entre as quantidades de gliadinas e gluteninas no glúten (WIESER, 2007).

3.1.2.1.3 *Glutenina*

As gluteninas e gliadinas são semelhantes em composição de aminoácidos, porém diferem em ligações. As gliadinas possuem ligações dissulfídicas intramoleculares, enquanto as gluteninas possuem ligações dissulfídicas intermoleculares. Assim, ao realizar a redução dessas ligações dissulfídicas com um agente redutor, como o ditioneitol, ocorre a liberação das subunidades de glutenina, que podem ser separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (STAUFFER, 2007).

Essas subunidades podem ser classificadas em: subunidades de alto peso molecular (APM), que podem ser divididas em tipo x e tipo y e, subunidades de baixo peso molecular (BPM) (GROSH; WIESER, 1999). A Tabela 7 traz a caracterização de cada uma dessas subunidades (WIESER, 2007):

Tabela 7 - Caracterização das proteínas da glutenina no trigo

Tipo	Peso Molecular (kDa)	% em relação ao total de proteínas do glúten	Composição Parcial dos aminoácidos (%mols)				
			Q	P	F	Y	G
x-APM	83-88	4-9	37	13	0	6	19
y-APM	67-74	3-4	36	11	0	5	18
BPM	32-39	19-25	38	13	4	1	3

Fonte: Autor "adaptado de" Koehler e Wieser, 2013

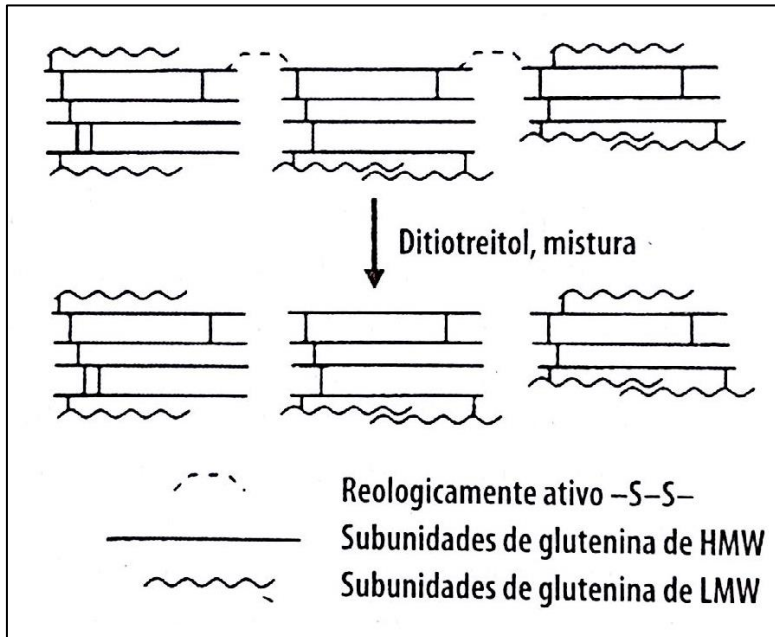
Nota: Q = Glutamina, P = Prolina, F = Fenilalanina, Y =Tirosina, G = Glicina, APM = Alto Peso Molecular, BPM = Baixo Peso Molecular

É evidente a maior composição de glutamina e prolina nos três grupos em comparação com outros aminoácidos. Já os grupos BPM estão em maior proporção na quantidade de proteínas totais do glúten do que os demais grupos APM.

Dessa forma, levando-se em consideração a diversidade estrutural, foram formuladas diversas propostas em relação a estrutura das gluteninas, porém a dificuldade dessa proteína em ser investigada torna este processo muito mais complexo. Neste contexto, uma das propostas referentes à investigação da estrutura da glutenina foi o estudo com adição de ditiotreitól à farinha de trigo e subsequente análise em farinógrafo. Nesta análise, o equipamento verifica a qualidade da mistura e tempo de desenvolvimento (STAUFFER, 2007).

De acordo com os resultados, assim que analisada a farinha de trigo com a adição do agente redutor, verifica-se que esta perde força. Dessa forma, GAO et al. (1992) elaborou um modelo de estrutura da glutenina na massa, mostrado na Figura 7.

Figura 7 - Proposta de estrutura da glutenina na massa



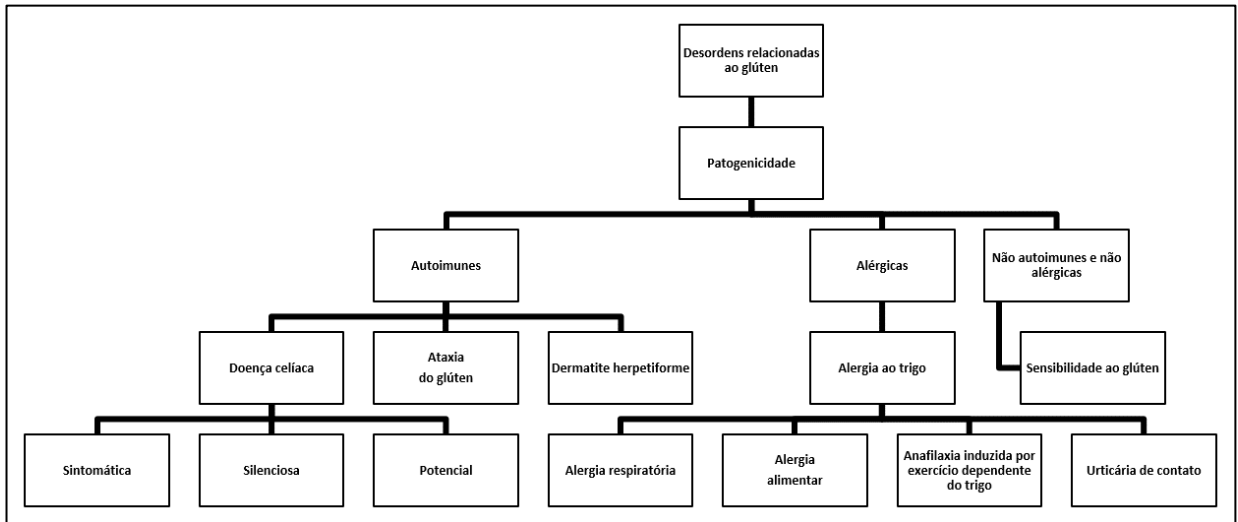
Fonte: Autor "adaptado de" Gao et al., 1992

3.1.2.1.4 Problemas relacionados ao glúten

Verifica-se atualmente um aumento significativo do número de pessoas que apresentam alguma intolerância ou desordem relacionada ao glúten (cerca de 1 a 2% da população mundial). Por conta disto, o consumo de alimentos sem glúten tem aumentado substancialmente nos últimos anos, embora sua produção exista há mais de 50 anos (CARDOSO et al., 2019; HENGGELER; VERÍSSIMO; RAMOS, 2017; HAGER et al., 2014).

As desordens associadas ao glúten podem ser classificadas de acordo com sua patogenicidade como: autoimunes, alérgicas e não autoimunes e não alérgicas, conforme a Figura 8.

Figura 8 - Classificação das desordens relacionadas ao glúten



Fonte: Autor "adaptado de" Sapone et al., 2012

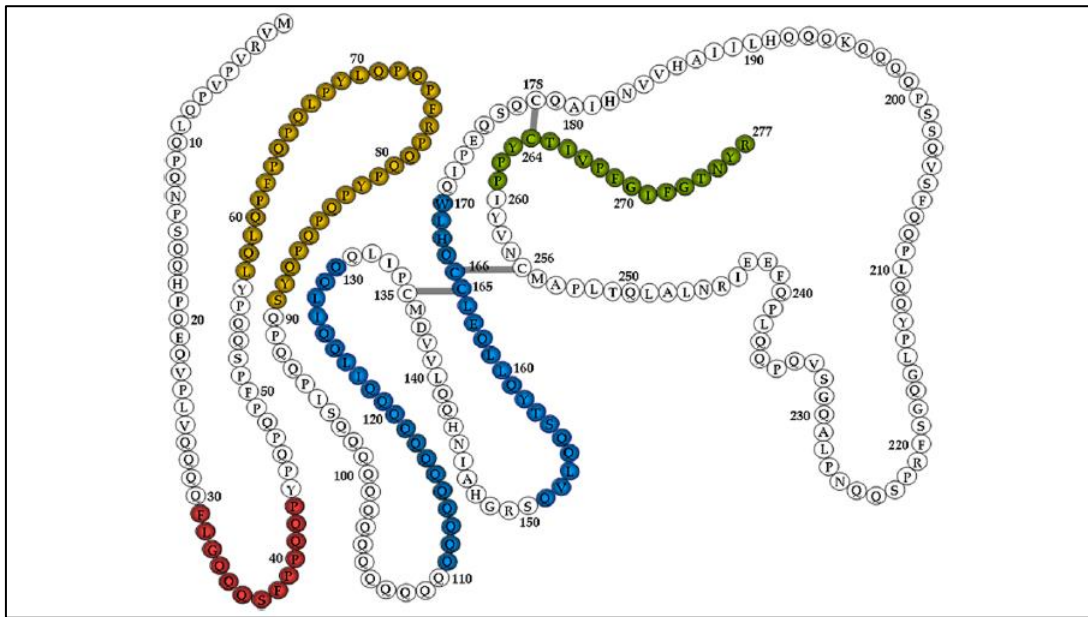
a) Desordens autoimunes

- Doença celíaca

A doença celíaca é uma enteropatia imunomediada pela ingestão do glúten, que afeta em torno de 1 a 2 % da população. É considerada uma das doenças de maior relevância no cenário atual, tendo a predisposição genética como fator primordial para o seu desenvolvimento, com os seguintes genes responsáveis por isso: HLA-DQ2 e HLA-DQ8, localizados em 6p21 (GOBBETTI et al., 2018; VOJDANI; VOJDANI, 2017; RIBEIRO et al., 2018; ROSELL et al., 2014; SAPONE et al., 2012).

As proteínas do glúten são resistentes à ação das enzimas digestivas, o que leva a formação de derivados de peptídeos, principalmente da α -glutenina, especificados na Figura 9, que, por sua vez, desencadeiam a ação do sistema imunológico em pacientes com a doença celíaca (SILVA; FURLANETTO, 2010).

Figura 9 - Mapeamento das regiões indutoras de desordem da α -gliadina

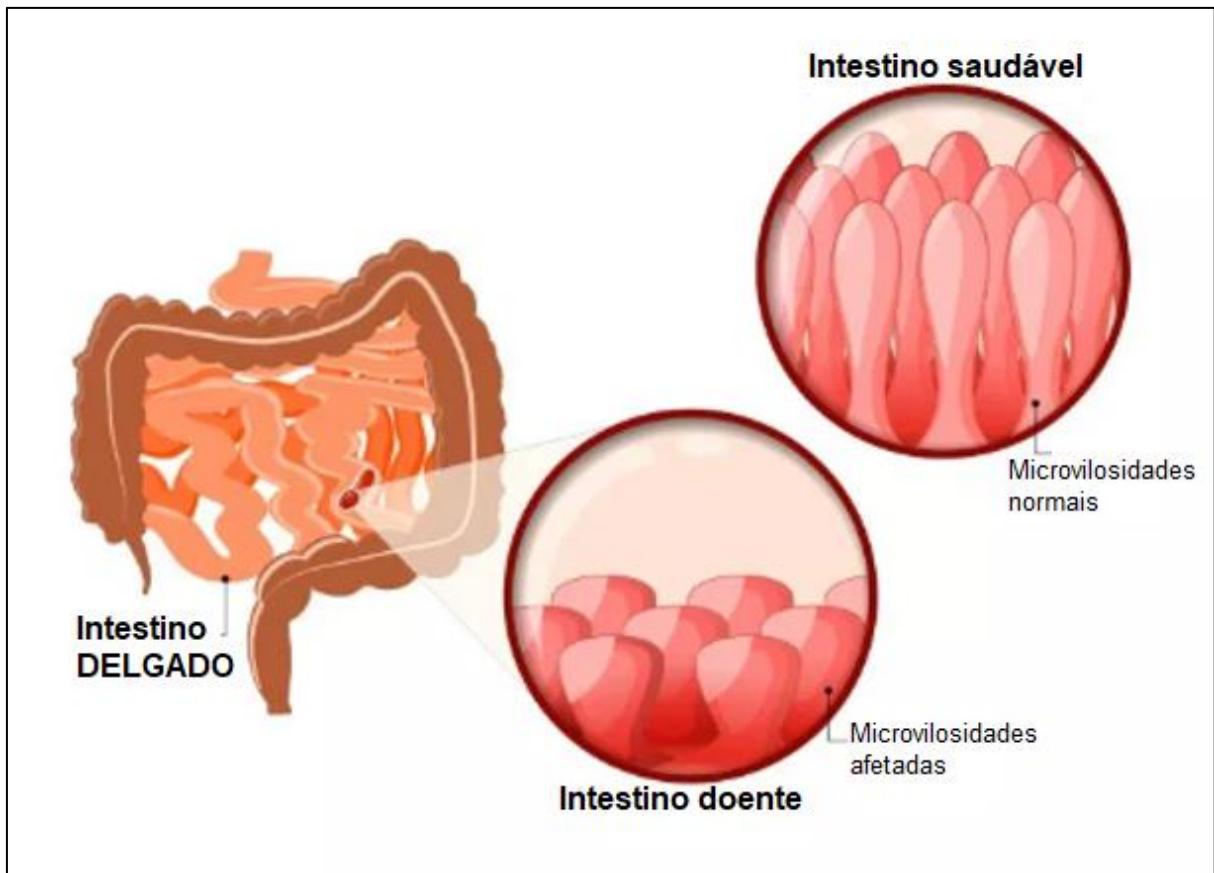


Fonte: Autor "adaptado de" Sapone et al., 2012

Esses derivados de peptídeos, quando em contato com enzimas específicas do trato gastrointestinal, geram algumas atividades imunoestimulatórias. A região mostrada em vermelho na Figura 9 exerce atividade citotóxica; a região em amarelo provoca um aumento da atividade imunomoduladora; as regiões em azul geram a liberação de zonulina e modulam a permeação intestinal; já a região mostrada em verde é responsável pela liberação da interleucina pró-inflamatória IL-8 dependente do receptor CXCR3 em pacientes com doença celíaca (RIBEIRO et al., 2018; MONTSERRAT et al., 2015; SAPONE et al., 2012).

Quando um paciente apresenta a doença celíaca, verifica-se uma combinação importante de sintomas devidos a distúrbios tanto do sistema imunológico adaptativo quanto do inato. Esses sintomas levam ao desencadeamento de inúmeros problemas de saúde, como inflamações no intestino delgado, que leva a uma diminuição das microvilosidades intestinais, prejudicando seriamente a absorção de nutrientes importantes (Figura 10), colite, urticária, inchaço na boca e nos lábios, angioedema, obstrução brônquica, anemia, osteoporose, retardo no crescimento, diarreia, fadiga, perda de peso, dores articulares, dores de cabeça, náusea, dor abdominal e até mesmo anafilaxia sistêmica, infertilidade e alterações neurológicas e hormonais, sendo esses últimos problemas mais comumente observados em mulheres (RIBEIRO et al., 2018; RUBAL-PEACE; SEPP, 2018; VOJDANI; VOJDANI, 2017; HENGGELE; VERÍSSIMO; RAMOS, 2017).

Figura 10 - Diferença entre as microvilosidades de um intestino saudável e de um afetado pela doença celíaca



Fonte: Autor "adaptado de" Celiac Disease Foundation.

- Dermatite herpetiforme

A dermatite herpetiforme é uma condição crônica causada pela ingestão do glúten, sendo uma forma de manifestação cutânea da doença celíaca, onde o paciente passa a apresentar erupções cutâneas recorrentes, com aspecto bolhoso e prurido (Celiac Disease Foundation) (SAPONE et al., 2012).

O diagnóstico dessa doença é feito através de diversos fatores, entre eles a observação da disposição das feridas que se formam, que aparecem com uma simetria característica nos cotovelos e antebraços, em cerca de 90% dos pacientes. Poucos pacientes apresentam sintomas de enteropatias associados à dermatite herpetiforme, entretanto, mesmo em pacientes normais, a realização de biópsias evidencia uma diminuição nas vilosidades intestinais em 65 a 75% desses pacientes, gerando prejuízos importantes na absorção de nutrientes (SAPONE et al., 2012).

- Ataxia do Glúten

Ataxia é uma condição neurológica autoimune na qual se tem como principal sintoma a perda de controle muscular durante movimentos voluntários, devido à danos causados ao cerebelo. No caso da ataxia relacionada ao glúten, essa condição passou a ser considerada uma vez que, em estudos que envolviam pacientes com ataxia progressiva, verificou-se que cerca de 23% dos pacientes avaliados apresentaram evidências de sensibilização ao glúten através da alta prevalência de anticorpos anti-gliadina, quando comparados a grupos controle saudáveis (SAPONE et al., 2012).

A ataxia pode ocorrer na forma cerebelar pura ou afetar outras regiões do encéfalo, em raros casos. Alguns sinais clínicos são percebidos, como perda de olfato e problemas na visão, em cerca de 80% dos casos. O sintoma clínico clássico da doença que se mostra presente em todos os pacientes é a disfunção da marcha e ataxia de membros (SAPONE et al., 2012).

b) Desordens alérgicas – Alergia ao trigo

A alergia ao trigo é definida como uma reação adversa às proteínas do trigo. A mesma pode ser traduzida de diferentes formas, que ocorrem de maneira isolada ou simultaneamente como, por exemplo, alergias respiratórias (asma ou bronquite), alergia do trato gastrointestinal, anafilaxia induzida por exercício dependente do trigo e, até mesmo, urticária de contato. A amplitude sistêmica abordada por esse tipo de alergia se dá devido ao caminho que o alérgeno percorre no organismo da pessoa que sofre com essa doença.

O diagnóstico de primeiro nível é feito através de sorologia investigativa para determinados tipos de anticorpos IgE (SAPONE et al., 2012).

c) Desordens não autoimunes e não alérgicas – Sensibilidade ao glúten

Pacientes que apresentam essa condição, normalmente, reportam um desconforto ao se alimentarem de fontes que contenham glúten, relatando um bem-estar maior quando aderem à dieta livre de glúten. Normalmente, o intestino delgado desses pacientes é normal, mesmo quando submetido à biópsia. A sensibilidade ao glúten é uma doença distinta da doença celíaca, não acompanhada pelos fatores

imunológicos. Entretanto, a distinção nos diagnósticos é complicada, uma vez que os sintomas de ambas são praticamente os mesmos (RUBAL-PEACE; SEPP, 2018; STOVEN; MURRAY, MARIETTA, 2012).

Dessa forma, o diagnóstico de sensibilidade ao glúten é dado como diagnóstico de exclusão, uma vez que os testes sorológicos utilizados tanto para as doenças autoimunes quanto para as doenças alérgicas não apresentam alterações. Alguns sintomas não relacionados ao intestino também são prevalentes nesse tipo de desordem como, por exemplo, dores ósseas e articulares, dormência nas pernas, perda de peso e, até mesmo, fadiga. Os genes responsáveis pela alteração clínica dos pacientes que possuem a doença celíaca estão presentes em apenas 50% dos pacientes que apresentam sensibilidade ao glúten (RUBAL-PEACE; SEPP, 2018; STOVEN; MURRAY, MARIETTA, 2012).

Assim, devido aos vários problemas associados ao glúten e suas proteínas, bem como um aumento significativo de relatos de problemas relacionados ao consumo de alimentos com elevados teores de glúten nos últimos 60 anos, estudos relacionados a possibilidades de tratamentos de intolerâncias ao mesmo têm crescido significativamente, bem como a venda de alimentos sem de glúten (RUBAL-PEACE; SEPP, 2018; STOVEN; MURRAY, MARIETTA, 2012).

Neste contexto, vários medicamentos à base de proteases específicas que possibilitem a degradação do glúten ao serem administrado oralmente têm se mostrado uma alternativa promissora, tanto que várias empresas já estão realizando as fases de 1 a 3 no teste de medicamentos à base de diferentes proteases.

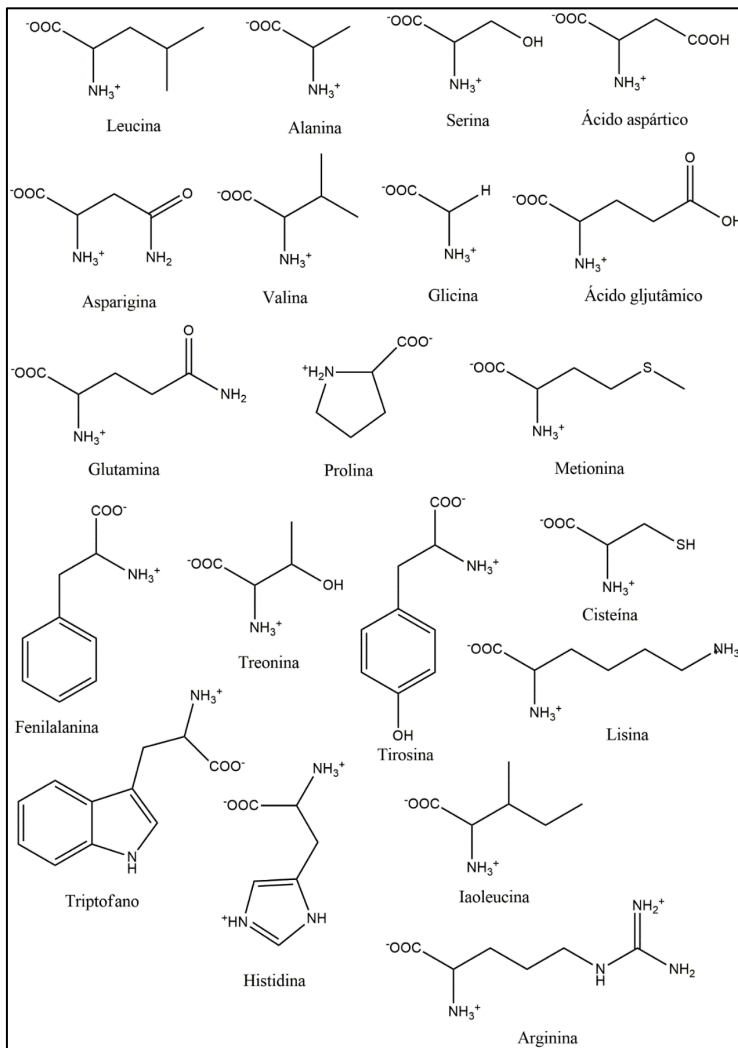
Da mesma forma, vacinas que permitam o desenvolvimento de uma resistência ao glúten também estão sendo testadas paralelamente ao uso desses medicamentos (RUBAL-PEACE; SEPP, 2018; STOVEN; MURRAY, MARIETTA, 2012).

3.2 ENZIMAS

Proteínas são estruturas formadas por unidades monoméricas denominadas aminoácidos e desempenham papel fundamental na manutenção da vida, uma vez que controlam quase todos os processos de biossíntese, processos estruturais e de transporte presentes em todos os organismos conhecidos. Essas proteínas, das mais simples às mais complexas, são formadas a partir dos mesmos 20 aminoácidos principais e alguns aminoácidos especiais (Figura 11), que se ligam entre si através

de ligações peptídicas e, em alguns casos, essas proteínas são, ainda, acrescidas a outras moléculas, como lipídeos, carboidratos ou íons, dependendo de sua função (ORLANDELLI et al., 2015; CAMPBELL; FARRELL, 2007; FERSHT, 2000; WOLFE, 1995).

Figura 11 - 20 aminoácidos principais



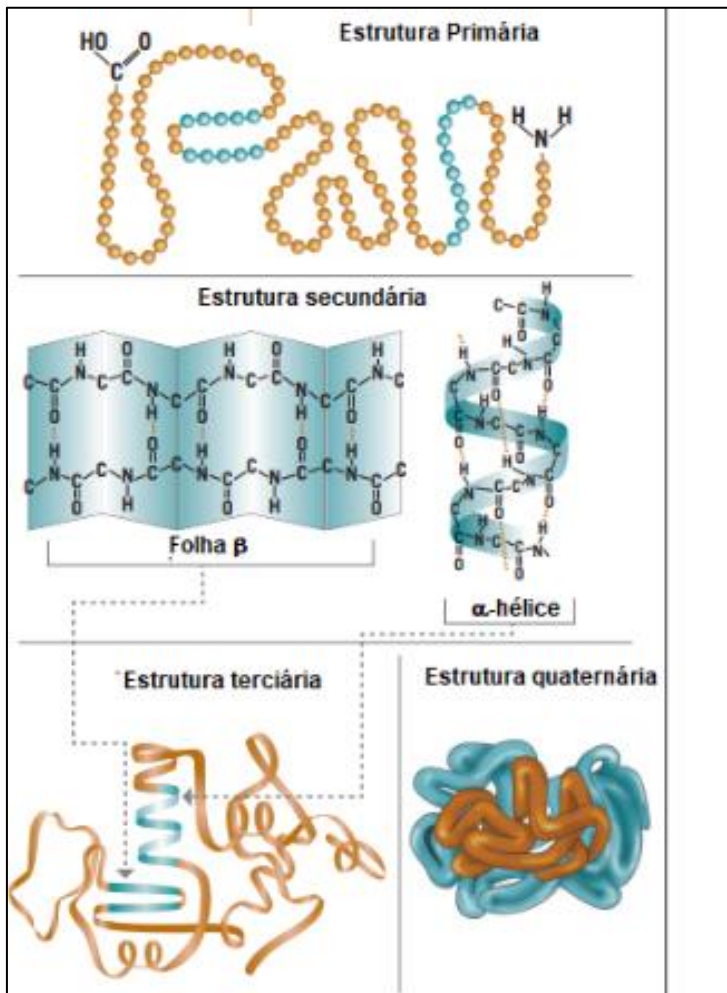
Fonte: autor "adaptado de" Campbell e Farrell, 2007

As proteínas possuem quatro níveis estruturais (Figura 12) (ORLANDELLI et al., 2015; CAMPBELL; FARRELL, 2007):

- Estrutura primária: Corresponde a sequência de aminoácidos (ordem na qual os aminoácidos são ligados através de ligações covalentes)

- b) Estrutura secundária: Corresponde ao arranjo espacial dos átomos na estrutura peptídica (ocorre devido a interação entre os aminoácidos mais próximos em α -hélice ou folha β)
- c) Estrutura terciária: Corresponde a interações intramoleculares e, assim, ao arranjo tridimensional (enovelamento) de todos os átomos da proteína (incluindo cadeias laterais e grupos prostéticos – grupos que não são aminoácidos)
- d) Estrutura quaternária: Não está presente em todas as proteínas e representa a interação entre as cadeias polipeptídicas individuais via atrações eletrostáticas, ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas

Figura 12 - Estruturas primária, secundária, terciária e quaternária das proteínas



Fonte: Autor "adaptado de" Particle Sciences, 2009.

As enzimas representam uma classe especial de proteínas, com massas moleculares entre 12.000 e até mais de 1.000.000 Da, que apresentam capacidade

de catalisar reações e desempenhar outras inúmeras funções orgânicas (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995). Por conta de sua alta complexidade e diversidade, as enzimas têm sido amplamente estudadas a fim de aprimorar sua aplicabilidade nas mais diversas áreas. Entretanto, é primordial para definição da aplicação, que se conheça o mecanismo de ação da enzima de interesse (Tabela 8), bem como seus inibidores, ativadores e condições ideais de atividade, principalmente no que diz respeito ao pH, temperatura, ativação por íons e aplicação em processos (BON et al., 2008; FERSHT, 2000; WOLFE, 1995; DIXON, 1964).

O fato de as enzimas apresentarem alta especificidade durante o processo catalítico, bem como condições específicas de pH e temperatura ideais, faz com que se mostrem como uma alternativa promissora em processos biotecnológicos. A alta especificidade das enzimas é dada graças ao sítio ativo, região onde grupos químicos do substrato interagem com grupos específicos da enzima. Estes grupos químicos são complementares ao sítio ativo no que diz respeito à tamanho, forma, carga e caráter de interação com a água (LIN; HE, 2018; LEHNINGER; NELSON; COX, 1995).

Tabela 8 - Classe de enzimas e funções

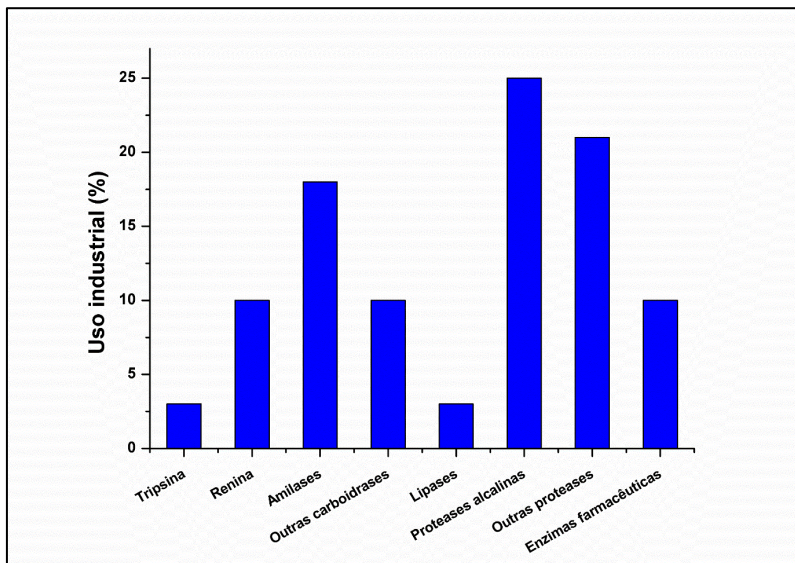
Classe	Função
Oxidoredutases	Responsáveis por catalisar reações que envolvem a transferências de elétrons (ex: desidrogenases e oxidases)
Transferases	Responsáveis por catalisar reações que levam a transferência de grupamentos funcionais (ex: grupos amino, fosfato, acil, carboxil, isoprenil, etc)
Hidrolases	Catalisam reações de quebra de ligações covalentes (ex: proteases, lipases, etc)
Liases	Catalisam a quebra de ligações covalentes e a remoção de moléculas de H ₂ O, NH ₃ ou CO ₂ (ex. desidratases e descarboxilases)
Isomerases	Catalisam reações de interconversão entre isômeros ópticos ou geométricos (ex: epimerases)
Ligases	Catalisam reações de formação de novas moléculas a partir da ligação entre duas já existentes utilizando ATP (ex. sintases)

Fonte: Autor "adaptado de" Bon et al., 2008; Fersht, 2000; Lehninger, Nelson e Cox, 1995

3.2.1 Proteases

A diversidade de enzimas utilizadas na indústria vem aumentando com o passar dos anos e as proteases possuem um grande destaque (Figura 13):

Figura 13 - Principais enzimas utilizadas industrialmente



Fonte: Autor “adaptado de” Rao et al., 1998

As proteases pertencem ao grupo 3 das hidrolases e subgrupo 4, segundo a classificação da Comissão de Enzimas da União Internacional de Bioquímica, e representam a classe de enzimas mais importante comercialmente e industrialmente, sendo responsáveis por aproximadamente 60% do mercado de enzimas, podendo-se destacar o uso da papaína, bromelina, queratinases, entre outras (MOKASHE; CHAUDHARI; PATIL, 2018; RAO et al., 1998).

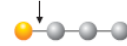
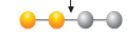

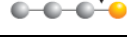
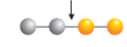
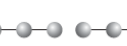
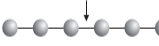
As proteases podem ser classificadas de acordo com a fonte de isolamento (microrganismos, plantas ou animais), da análise do sítio ativo, carga, tamanho (peso molecular) e especificidade em reações químicas (BOSE; HOWITT; COLGRAVE, 2019; AGUILLAR; SATO, 2018; RAO et al., 1998).

Com relação a fonte de isolamento das proteases, os microrganismos têm se mostrado uma alternativa promissora devido às inúmeras vantagens econômicas como, por exemplo, a elevada diversidade de microrganismos, rápido crescimento dos mesmos e possibilidade de sua manipulação genética (AGUILLAR; SATO, 2018).

As proteases são responsáveis por hidrolisar ligações peptídicas específicas em proteínas e peptídeos durante processos reacionais, sendo possível dividi-las também em função da reação catalisada (Tabela 9) (AGUILLAR; SATO, 2018; MOKASHE; CHAUDHARI; PATIL, 2018; RAO et al., 1998):

- a) Endopeptidases – Responsáveis por romper ligações peptídicas no meio da cadeia como, por exemplo, as serino proteases, cisteíno proteases, aspártil proteases e metaloproteases e;
- b) Exopeptidases – Levam ao rompimento de ligações peptídicas próximo ao C ou N terminal, como as carboxipeptidases (serino protease, metaloprotease ou cisteíno protease) e aminopeptidases, respectivamente. (BOSE; HOWITT; COLGRAVE, 2019; AGUILLAR; SATO, 2018; RAO et al., 1998).

Tabela 9 - Classificação das proteases

	Tipo de quebra	Protease	Modo de ação
Exopeptidases	N-terminal	Aminopeptidases	
		Dipeptidil peptidase	
		Tripeptidil peptidase	
	C-terminal	Carboxipeptidases	
		Proteases do tipo serina Metaloproteases Proteases do tipo cisteína Peptidil dipeptidase	
		Dipeptidase Ômega peptidases	
Endopeptidases		Proteases aspárticas Cisteína Proteases Metaloproteases Serina Proteases	
		Endopeptidases sem mecanismo catalítico definido	

Fonte: Autor “adaptado de” Rao et al., 1998

As serino proteases são encontradas em vírus, bactérias e seres eucariontes, sendo comumente produzida por bactérias do gênero *Bacillus*. Possuem no seu sítio ativo a tríade catalítica serina-histidina-ácido aspártico e, geralmente, possuem atividade em pH's neutros e alcalinos, sendo o valor ótimo entre os pH's 7 e 11. Já, as cisteíno proteases são encontrados tanto em seres eucariontes como em seres procariontes, sendo fontes comuns desta protease o abacaxi, o figo e o mamão. Seu sítio ativo é composto por cisteína-ácido aspártico-histidina e possuem ótima atividade em pH's neutros ou ácidos (catepsina).

As aspártil proteases são encontradas em fungos do gênero *Aspergillus* dentre outros e no estômago da maioria dos animais vertebrados. Possuem no seu sítio ativo

dois resíduos de ácido aspártico e são conhecidas como proteases ácidas, devido a sua ótima atividade em pH's ácidos, obtendo uma máxima atividade nos pH's 3 e 4.

Por último, as metaloproteases são encontradas em diversos tipos de fontes como bactérias, fungos e veneno de algumas serpentes e outros animais peçonhentos. Necessitam de um íon metálico bivalente para serem ativadas e possuem subclasses que atuam tanto em pH neutro como subclasses que atuam em pH alcalino (MAMO; ASSEFA, 2018; MURI, 2014; RAO et al., 1998).

As proteases podem ser divididas, ainda, em função do seu pH de atuação em:

- a) Ácidas - Atuam na quebra de ligações envolvendo cadeias laterais volumosas de aminoácidos aromáticos em ambos os lados da ligação de clivagem;
- b) Neutras - Possuem alta afinidade por aminoácidos hidrofóbicos e possuem baixa tolerância térmica;
- c) Básicas - Atuam na hidrólise de ligações contendo tirosina, fenilalanina, leucina (próximo ao grupo carboxila terminal, aspartato, histidina e serina) (Tabela 9).

Devido à grande diversidade de proteases, seu campo de atuação na indústria é extremamente extenso, podendo ser destacada a aplicação na indústria de detergentes, couro, cosméticos, farmacêuticos, têxteis, alimentos, processamento de resíduos, entre outras (MOKASHE; CHAUDHARI; PATIL, 2018; RAO et al., 1998).

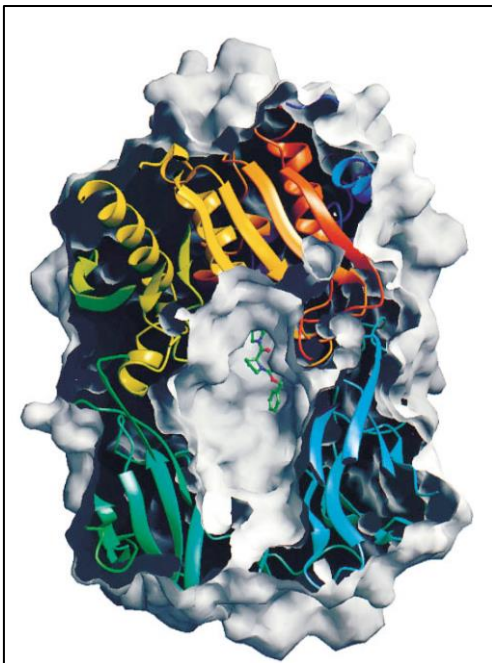
Destaca-se também a presença de proteases em diversas etapas do metabolismo humano e de plantas, como por exemplo, na digestão de proteínas no intestino e no estômago, na maturação de pró-hormônios para geração de proteínas e peptídeos envolvidos na termorregulação, reprodução em humanos, no processamento e maturação de proteínas específicas em plantas, etc. (BOSE; HOWITT; COLGRAVE, 2019).

3.2.1.1 *Proteases específicas para hidrólise do glúten*

Devido a sua atuação no metabolismo humano e, principalmente em processos digestivos, problemas relacionados a produção de algumas enzimas específicas têm sido muito estudados. Como exemplo pode ser citada a deficiência na produção de enzimas específicas envolvidas na hidrólise das ligações peptídicas presentes no glúten, o que leva à desconfortos e sintomas característicos da intolerância ao glúten, após o consumo do mesmo (BOSE; HOWITT; COLGRAVE, 2019; HAGER et al., 2014).

Dessa forma, muitas pesquisas têm sido desenvolvidas visando a busca por enzimas capazes de hidrolisar o glúten. Neste contexto, a prolil oligopeptidase, (Figura 14), pertencente a subfamília S9A das serino endopeptidase, tem se mostrado promissora, uma vez que mostra capacidade de hidrolisar as sequências peptídicas específicas responsáveis pela intolerância ao glúten (YADAV et al., 2018; SHETTY et al., 2017; HAGER et al., 2014).

Figura 14 - Estrutura superficial da enzima proliloligopeptidase

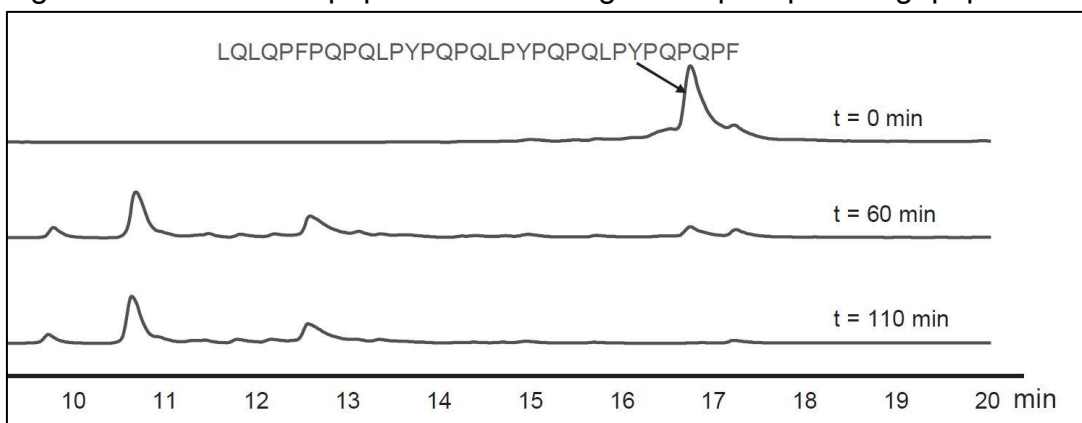


Fonte: Fulop, Bocskei e Polgar, 1998

Observa-se no trabalho de Shan e colaboradores (2002) a identificação de uma região fisiologicamente estável da gliadina e, possivelmente, responsável pelo

desenvolvimento da doença celíaca. Foi testada, então, a digestão desse peptídeo a partir da enzima prolil oligopeptidase, conforme observado na Figura 15.

Figura 15 - Quebra do peptídeo 3-mer da gliadina pela prolil oligopeptidase



Fonte: Shan et al., 2002

Observa-se que essa enzima demonstra alta capacidade de hidrolisar o peptídeo em questão. Assim, é possível afirmar que as proteases possuem grande relevância no estudo de alternativas aos tratamentos atualmente aplicados em pacientes que sofrem de alguma alteração fisiológica pela presença de peptídeos imunogênicos, razão pela qual fontes dessas enzimas têm sido estudadas e alguns microrganismos, como os fungos, têm se mostrado promissores, uma vez que possuem alta capacidade de síntese dessas moléculas.

Como destaque, podem ser reportados trabalhos envolvendo a aplicação de *Aspergillus niger* na produção de cervejas visando a quebra da fração prolamina rica em prolina do glúten, além de outros trabalhos que demonstram a quebra do glúten da farinha de trigo utilizando extratos enzimáticos obtidos a partir de *Flavobacterium meningosepticum*, *Xanthomonas* sp., *Aeromonas hydrophilic*, *Sphingomonas capsulate*, *Halobacterium halobium* S9, *Lactobacillus helveticus*, *Myxococcus xanthus*, *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger*, que mostraram eficiência na degradação peptídeos imunogênicos de gliadina do trigo (SHETTY et al., 2017; HAGER et al., 2014).

3.3 FUNGOS ENDOFÍTICOS

Os fungos endofíticos, existentes há pelo menos 400 milhões de anos, são considerados microrganismos simbioticamente associados a tecidos internos de plantas, como folhas, caules, casca, raízes, frutos, flores e sementes (LI et al., 2018; TOGHUEO et al., 2017).

O termo endofítico foi criado pelo cientista alemão Heinrich Anton De Bary, em 1884, que utilizou o mesmo para descrever microrganismos (bactérias e fungos) que vivem associados a maioria das espécies de plantas (BAMISILE et al., 2018).

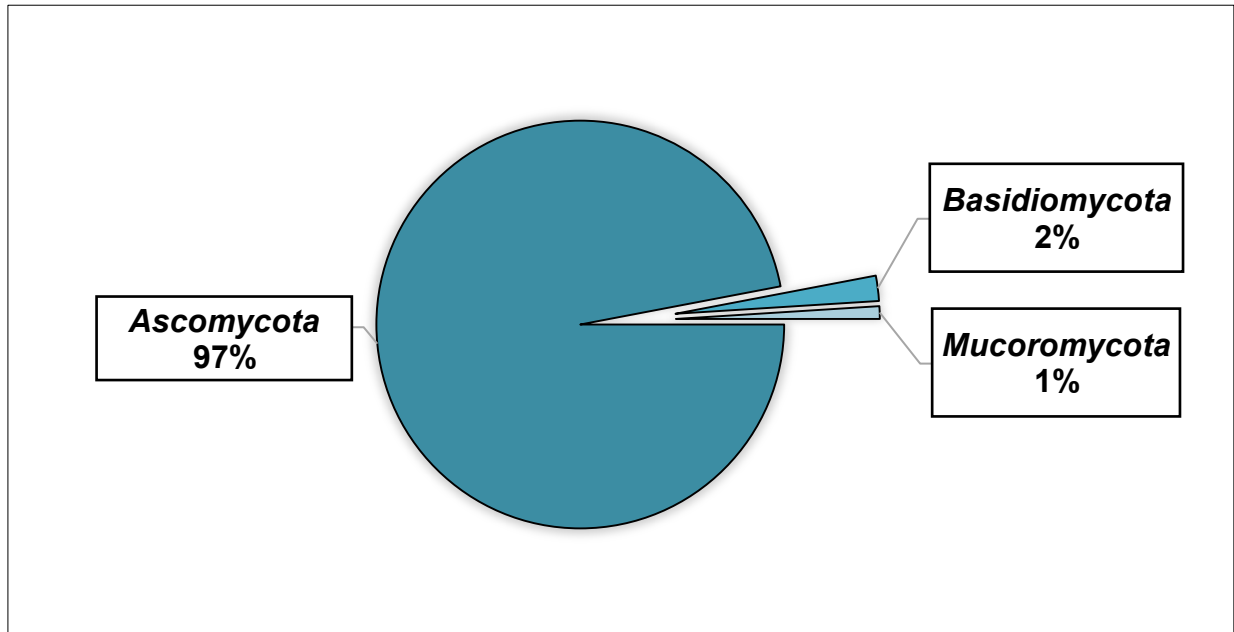
Durante essa associação, a planta fornece nutrição e refúgio aos fungos. Em contrapartida, os mesmos promovem o controle de pragas, a tolerância a seca, a decomposição foliar, auxiliam no fluxo de nutrientes, pH e umidade e fornecem alguns metabólitos secundários importantes para o crescimento de plantas, caracterizando, assim, essa relação como uma simbiose de mutualismo (LI et al., 2018; MANGANYI et al., 2018; YANG et al., 2018; FERNANDES et al., 2015).

Porém, microrganismos endofíticos podem se tornar patógenos caso ocorra um desequilíbrio entre a virulência, característica de vários desses microrganismos e a defesa da planta (ANDRADE et al., 2018). Essa característica indica que esses fungos foram, no passado, uma forma latente de patógeno (FERNANDES et al., 2015). Como exemplo é possível citar alguns fungos da família *Botryosphaeriaceae* (TOGHUEO et al., 2017).

Além da produção de vários metabólitos secundários, os mesmos também têm sido considerados uma fonte promissora de enzimas para as indústrias, como as hidrolases, classe a que pertencem as proteases, as celulases, xilanases, amilases, pectinases e enzimas ligninolíticas oxidativas (MARQUES et al., 2018; RAJAMANI et al., 2018; TOGHUEO et al., 2017).

Como exemplos de fungos endofíticos já isolados e identificados, podem ser citadas espécies do filo Ascomycota (97%), Basidiomycota (2%) e Mucoromycota (1%) (Figura 16) (LI et al., 2018).

Figura 16 - Porcentagem de fungos endofíticos isolados de cada filo de 2014 a 2017



Fonte: Autor "adaptado de" Li et al., 2018

Embora a diversidade de fungos endofíticos seja muito ampla, muitas espécies ainda são desconhecidas e, dentre as mais estudadas atualmente, podem ser destacadas as espécies *Beauveria basiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Isaria farinosa*, *Cladosporium* spp., *Fusarium oxysporum*, *Clonostachys rosea*, *Hypocrea lixii*, *Acremonium* spp., *Lecanicillium lecanii*, *Gibberella moniliformis*, *Aermonas hydrophilic*, *Sphingomonas capsulate*, *Halobacterium halobium*, *Myxococcus xanthus*, *Phomopsis* sp., *Fusarium tricinctum*, *Xylaria plebeja*, *Xylaria* sp., *Dothideomycete* sp., *Diaporthe melonis*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus versicolor*, *Alternaria solani*, *Aspergillus sydowii*, *Aspergillus niger* e *Trichoderma asperellum*, encontradas em associação à diversas plantas diferentes (Tabela 10) (BAMISILE et al., 2018; RUSSO et al., 2018; DEZAM et al., 2017; GREENFIELD et al., 2016; ZEILINGER, MARTÍN, GARCÍA-ESTRADA, 2015).

Tabela 10 - Alguns fungos endofíticos associados a diferentes plantas

Planta hospedeira	Fungos endofíticos encontrados
Milho	<i>Beauveria bassiana</i> , <i>Clonostachys rosea</i> e, <i>Metarhizium</i> sp.
Feijão comum	<i>B. bassiana</i> , <i>Hypocrea lixi</i> , <i>Gibberella moniliformis</i> , <i>Trichoderma asperellum</i> , <i>Lecanicillium lecanii</i> , <i>Aspergillus parasiticus</i> e, <i>Metarhizium</i> sp.
Cacau	<i>B. bassiana</i> , <i>Acremonium</i> sp., <i>Cladosporium</i> sp. e, <i>Gliocladium catenulatum</i>
Tomate	<i>B. bassiana</i> , <i>Cladosporium herbarum</i> , <i>M. anisopliae</i> , <i>Acremonium Strictum</i> , <i>L. lecanii</i> , <i>A. parasiticus</i> e, <i>Metarhizium brunneum</i>
Soja	<i>Cladosporium</i> sp., <i>Acremonium</i> sp., <i>B. bassiana</i> , <i>C. rósea</i> , <i>Metarhizium anisopliae</i> (Metschn.) e, <i>Metarhizium robertsii</i> Bisch
Café	<i>B. bassiana</i> , <i>Acremonium</i> sp., <i>Cladosporium</i> sp., <i>C. rósea</i> e, <i>Paecilomyces</i> sp.
Juta	<i>B. bassiana</i>
Arroz	<i>Paecilomyces</i> sp. e <i>B. bassiana</i>
Beterraba	<i>B. bassiana</i> e <i>M. anisopliae</i>
Cana de açúcar	<i>B. bassiana</i>
Morango	<i>B. bassiana</i>
Trigo	<i>B. bassiana</i>
Melão	<i>B. bassiana</i> e <i>M. brunneum</i>
Mandioca	<i>B. bassiana</i> e <i>M. anisopliae</i>
Banana	<i>B. bassiana</i> , <i>Fusarium oxysporum</i>
Algodão	<i>B. bassiana</i>
Cebola	<i>C. rosea</i> , <i>H. lixi</i> , <i>Fusarium</i> sp., <i>Trichoderma harzianum</i> e, <i>B. bassiana</i>
Batata	<i>B. bassiana</i>
Tabaco	<i>B. bassiana</i>
Maça brasileira	<i>Cladosporium</i> sp.

Fonte: Autor "adaptado de" Bamisile et al., 2018; Russo et al., 2018; Greenfield et al., 2016; Fishal, Meon e Yun, 2010

3.4 MANDIOCA

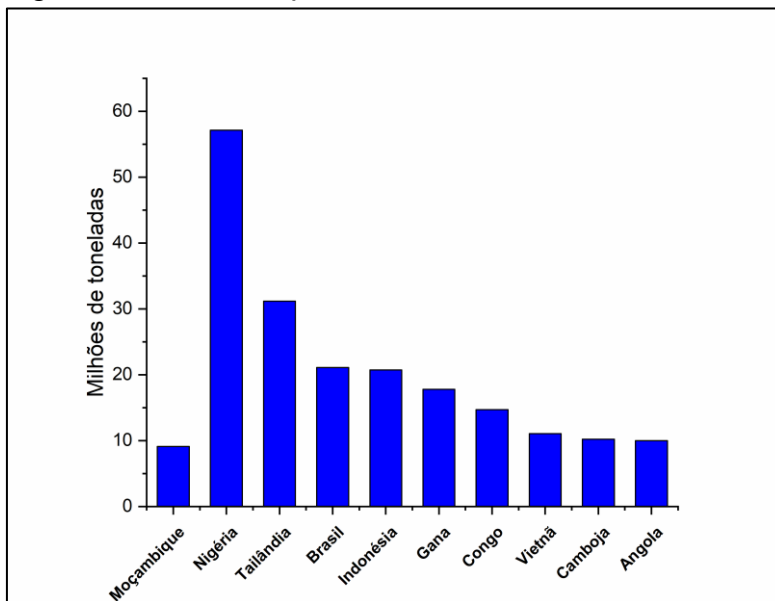
A mandioca, também conhecida como tapioca, yucca ou cassava (*Manihot esculenta*), pertencente à família Euphorbiaceae e ao gênero *Manihot*, é uma planta arbustiva nativa do Sul da África, capaz de crescer em diversos tipos de solos e que apresenta elevada resistência a períodos de seca prolongados, pHs baixos e elevadas concentrações de alumínio, porém mostra baixa resistência à umidade excessiva (PONGENER et al., 2018; BEAKOU et al., 2017; CAGNATO; PONCE, 2017; SÁNCHEZ et al., 2017; ALLEM, 1994).

A mandioca é insumo considerado de extrema importância na alimentação humana para aproximadamente 800 milhões de pessoas em todo o mundo, sendo que, das 98 espécies pertencentes a esse gênero, a espécie *Manihot esculenta* Crantz é uma das mais cultivadas e consumidas (primeira em consumo de raízes e terceira maior cultura do mundo) (GREENFIELD et al., 2016).

Sua domesticação ocorreu entre 5000-7000 a.C, gerando duas variedades diferentes: a doce e a amarga, que diferem somente com relação à concentração de glicosídeos cianogênicos, como por exemplo a linamarina e a lotaustralina (PONGENER et al., 2018; ZAINUDDIN et al., 2018; BEAKOU et al., 2017; LATIF; MÜLLER, 2015).

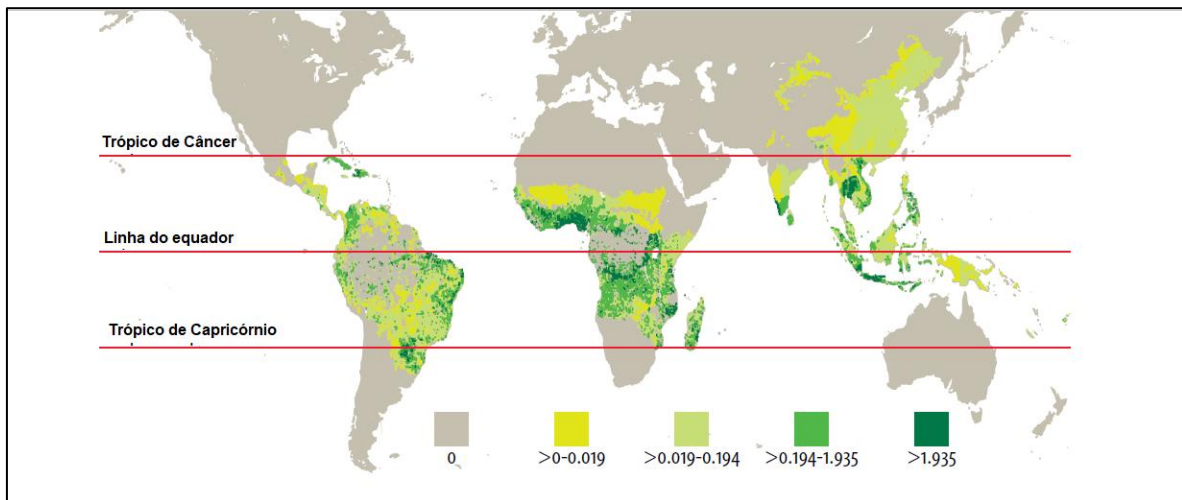
A mandioca, segundo registros, começou a ser cultivada nas Terras Baixas e Terras Altas da Guatemala, existindo também alguns relatos de sua aplicação na dieta dos maias em terras hoje pertencentes ao México, Panamá e El Salvador. Atualmente, a mesma é encontrada em todos os continentes, sendo a África tropical (principalmente a Nigéria e Gana) a maior produtora de mandioca do mundo, seguida pela Ásia (principalmente Tailândia e Indonésia), América Latina (principalmente no Norte e Nordeste do Brasil) e Caribe (Figuras 17 e 18) (TAPPIBAN et al., 2019; OYEYINKA et al., 2019; CAGNATO; PONCE, 2017; SÁNCHEZ et al., 2017; KHUMAIDA et al., 2015).

Figura 17 - Maiores produtores de mandioca do mundo



Fonte: Autor "adaptado de" Tappiban et al., 2019

Figura 18 - Produção global de mandioca (ha/km²)

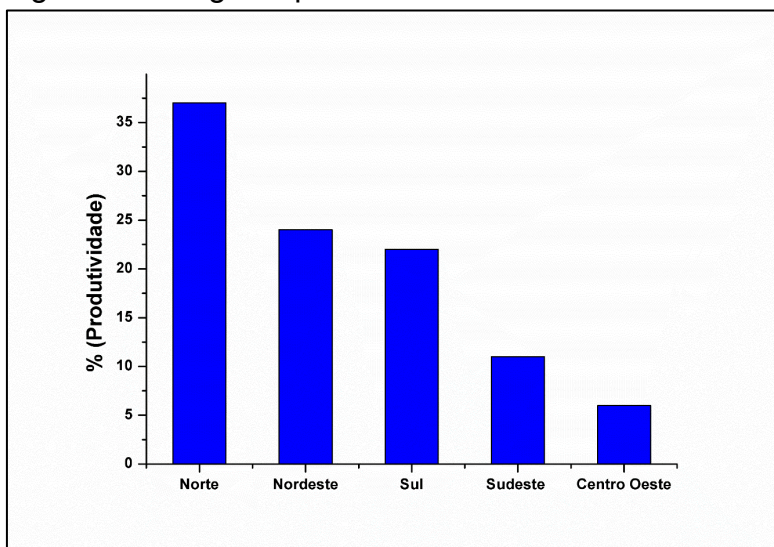


Fonte: Autor "adaptado de" Campanhola, 2013

No Brasil, a mandioca foi inicialmente cultivada na região amazônica, porém, atualmente, é amplamente encontrada em diversas regiões, principalmente no Norte e Nordeste brasileiros (Figura 18), que são as regiões de maior produção desse insumo no país (aproximadamente 111 t/há) (CAMPANHOLA, 2013).

Dessas regiões, destaca-se o Pará, que produz 20,45 % de toda a mandioca do país, seguido do Paraná (15,7 %), Bahia (8,6 %), e Maranhão (6,5 %), juntamente com o Acre (6,5 %) (Figura 19) (SEAB, 2017).

Figura 19 - Regiões produtoras de mandioca no Brasil



Fonte: Autor "adaptado de" Seab, 2017.

Devido à elevada produção de mandioca no mundo (aproximadamente 281,9 milhões de toneladas em aproximadamente 104 países), a quantidade de resíduos

gerados após seu processamento também se mostra significativa. Isso tem propiciado o desenvolvimento de estudos de aplicação desses resíduos, compostos principalmente por folhas, caules e raízes, nas mais diversas funções, incluindo: geração de bioenergia e biocombustíveis, produção de artesanatos e rações animais, obtenção de adsorventes de metais pesados e pigmentos, além de possibilidades de aplicação na obtenção de fungos associados a essas partes, os quais têm se mostrado fontes promissoras para a obtenção de enzimas de interesse industrial como, por exemplo, as proteases (TAPPIBAN et al., 2019; ZENG et al., 2019; SULAIMAN et al., 2018; BEAKOU et al., 2017; SÁNCHEZ et al., 2017; ADEKUNLE; ORSAT; RAGHAVAN, 2016).

3.4.1 Fungos endofíticos presentes na mandioca

A presença de fungos na mandioca já é estudada há muitos anos e muitos destes estudos levam a fungos causadores de doenças em plantas. Assim, podem ser citados os fungos causadores de podridão das raízes, como é o caso de *Phytophthora drechsleri*, ou os fungos causadores de manchas nas folhas, como no caso do *Cercospora henningsii*, sendo este último causador de uma das doenças mais comuns na mandioca.

Outros fungos podem ser responsáveis por outras manifestações na espécie, como no caso do fungo *Phyllosticta* sp., responsável pela perda das folhas e o fungo *Oidium manihoris*, causador de manchas amarela em folhas da planta. Fungos prejudiciais à saúde humana também já foram encontrados em mandioca, como no caso dos fungos *Penicillium* sp. e *Fusarium* sp. (BORBA et al., 2012; LOZANO; BOOTH, 1974; FIGUEIREDO; ALBUQUERQUE, 1970; VIEGAS, 1943).

Fungos do gênero *Alternaria* e *Cladosporium*, que já foram encontrados em amostras comerciais de farinha de mandioca e de milho em Goiânia, estão também associados com a produção de protease, o que reforça ainda mais a importância da busca de novas fontes dessas enzimas, especialmente em grande cultura de relevância nacional, como é o caso da mandioca (ORLANDELLI et al., 2015; LEMOS et al., 2001; HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Durante o desenvolvimento do presente trabalho, foram utilizados os materiais, equipamentos e metodologias descritos nos itens 4.1, 4.2 e 4.3.

4.1 MATERIAIS

Durante o desenvolvimento do presente trabalho foram utilizados:

- a) Farinha de trigo (Nordeste Alimentos com 29,1% de Glúten Úmido e 9,7% de Glúten Seco);
- b) Peptona (Sigma Aldrich);
- c) Batata dextrose agar - BDA (Sigma Aldrich);
- d) Hipoclorito de sódio (Dinâmica);
- e) Etanol 95% (Dinâmica);
- f) Sulfato de gentamicina (Sigma Aldrich);
- g) Albumina bovina (Sigma Aldrich);
- h) Polivinilpirrolidona – PVPP (Sigma Aldrich);
- i) Coomassie Brilhante Blue G-250 (Sigma Aldrich);
- j) Hidróxido de potássio (Dinâmica);
- k) Azocaseína (Sigma Aldrich);
- l) Ácido fosfórico (Dinâmica);
- m) Ácido tricloroacético (Dinâmica);
- n) Extrato de levedura (Sigma Aldrich);
- o) Fosfato monobásico de potássio (Dinâmica);
- p) Fosfato monobásico de sódio (Dinâmica);
- q) Fosfato dibásico de potássio (Dinâmica);
- r) Cloreto de sódio (Dinâmica);
- s) Sulfato de magnésio (Dinâmica);
- t) Glicose (Sigma Aldrich);
- u) Ninidrina (Sigma Aldrich);
- v) L-leucina (Sigma Aldrich);
- w) Cloreto de Potássio (Dinâmica);
- x) Ácido clorídrico (Dinâmica);

- y) Tween 80 (Sigma Aldrich);
- z) Cloreto de prata (Neon);
- aa) Acrilamida (Sigma Aldrich);
- bb) Bis-acrilamina (Sigma Aldrich);
- cc) Tris(hidroximetil)aminometano (Sigma Aldrich);
- dd) Dodecil sulfato de sódio - SDS (Sigma Aldrich);
- ee) Persulfato de amônio (Sigma Aldrich);
- ff) Glicina (Sigma Aldrich);
- gg) Tetrametiletenodiamina - EDTA (Sigma Aldrich);
- hh) *n*-butanol (Dinâmica);
- ii) Glicerina (Dinâmica);
- jj) 2-mercaptoetanol (Sigma Aldrich);
- kk) Azul de bromofenol (Sigma Aldrich);
- ll) Metanol (Dinâmica);
- mm) Ditioneitol - DTT (Sigma Aldrich);
- nn) Ácido acético (Dinâmica);
- oo) Agar-agar (Sigma Aldrich);
- pp) Formaldeído (Dinâmica);
- qq) Carbonato de sódio (Dinâmica);
- rr) Ácido cítrico (Dinâmica);
- ss) Citrato de sódio (Dinâmica);
- tt) Padrão peso molecular para eletroforese composto pelas enzimas fosforilase b, albumina sérica, ovoalbumina, anidrase carbônica, inibidora de tripsina e, α -lactalbumina (LMW-SDS Marker Kit) (Amersham).

4.2 EQUIPAMENTOS

Durante o desenvolvimento do presente trabalho foram utilizados:

- a) Autoclave horizontal para esterilização dos meios de cultura;
- b) Centrífuga refrigerada de bancada Universal 32 R da Hettich para a realização das centrifugações de extratos enzimáticos e de frações provenientes da precipitação salina;
- c) Freezer -80°C Panasonic para armazenamento dos extratos enzimáticos e frações pré-purificadas;

- d) Espectrofotômetro UV/VIS da Quimis para a realização das dosagens proteicas dos extratos enzimáticos e das frações bem como determinação da atividade de protease e de enzimas específicas envolvidas na hidrólise do glúten;
- e) Capela de fluxo laminar Veco para a realização dos cortes vegetais, inoculações e repiques dos meios.
- f) Câmara climatizada Panasonic para realização do crescimento dos fungos endofíticos.
- g) Shaker orbital Shaker Innova 43-Incubator Shaker Series para agitação e controle de temperatura das reações enzimáticas e crescimento dos fungos em meio líquido.
- h) Sequenciador automático por eletroforese capilar ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) para realização do sequenciamento do DNA dos fungos isolados.
- i) Sistema de eletroforese (Cuba eletroforese vertical OWL P8DS+ Fonte EC300 XL) Thermo.
- j) Pipeta eletrônica Brand 0,5-5 mL.

4.3 METODOLOGIAS

Durante o desenvolvimento do presente trabalho foram utilizadas as metodologias descritas nos itens 4.3.1 a 4.3.14.

4.3.1 Obtenção dos fungos a partir dos caules e folhas de mandioca

Inicialmente, durante o desenvolvimento do presente trabalho, foram coletadas amostras de caules com folhas provenientes de uma espécie de mandioca, mantida no Centro Universitário da FEI.

As amostras foram colhidas em 20/02/2018, no período da manhã, com auxílio de um estilete. Foram selecionados apenas caules e folhas com aparência sadia, sem manchas amarelas ou sinais de outras contaminações.

As amostras foram então lavadas com água estéril, solução de hipoclorito de sódio (NaClO) 2% e solução de etanol 70%, repetindo-se o procedimento com a água estéril (2 vezes) para a finalização do processo de desinfecção (MARQUES et al., 2018; SOUZA et al., 2004).

Posteriormente, os caules e as folhas, já desinfetados, foram cortados em pedaços de aproximadamente 1x1cm e colocados em meio de cultura batata dextrose ágar (BDA), esterilizado anteriormente em autoclave durante 15 minutos e 2 atm.

Foram adicionados ao meio, após o processo de autoclavagem, 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de sulfato de gentamicina, com o objetivo de evitar o crescimento de bactérias.

O cultivo foi realizado a 23 °C em uma câmara climatizada durante 10 dias, período necessário para que as colônias atingissem entre 3 a 8 cm de diâmetro (MARQUES et al., 2018). Após esse período, foram realizados repiques consecutivos em meio BDA para a obtenção das linhagens puras que foram, então, enviadas para identificação em laboratório de *Genotyping* (BPI Biotecnologia – Piracicaba-SP).

Todas as etapas de transferência e cortes foram realizadas em capela de fluxo laminar com luz UV.

4.3.2 Purificação dos fungos

Após a obtenção dos fungos, foi realizada a purificação das colônias com morfologia e coloração diferentes. Para isso, essas colônias foram transferidas para um novo meio BDA e deixadas em estufa a 23 °C por 5 dias, período necessário para o crescimento das colônias.

A análise foi realizada através da inspeção visual, considerando-se espécies de fungos diferentes aquelas que mostraram morfologia e coloração diferentes das demais. Os repiques dos fungos foram identificados de acordo com sua origem (caule ou folha) e numerados de acordo com sua morfologia.

Após a realização da análise morfológica de cada fungo, micélios dos mesmos foram armazenados em embalagens plásticas e deixados em freezer -80 °C para, posteriormente, serem obtidos os extratos enzimáticos de cada fungo isolado (ALTERTHUMM, 2001).

4.3.3 Identificação dos fungos

Foram enviadas amostras de cada um dos fungos obtidos ao laboratório de *Genotyping* (BPI Biotecnologia – Piracicaba-SP), para sequenciamento do DNA e identificação de cada um desses fungos de acordo com o banco de dados do laboratório. A identificação foi realizada através de sequenciamento automático por

eletroforese capilar no equipamento ABI 3500 *Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems*) e posterior alinhamento das sequências de nucleotídeos produzidas com as sequências de referência depositadas no *GenBank* (WHITE et al., 1990). Todos os fungos analisados apresentaram 99% de identidade com um respectivo fungo do banco de DNA.

4.3.4 Preparo do extrato enzimático bruto

Durante a obtenção dos extratos enzimáticos, micélios dos fungos foram retirados do freezer -80 °C e foi realizado o processo de preparo dos mesmos, conforme fluxograma apresentado na Figura 20.

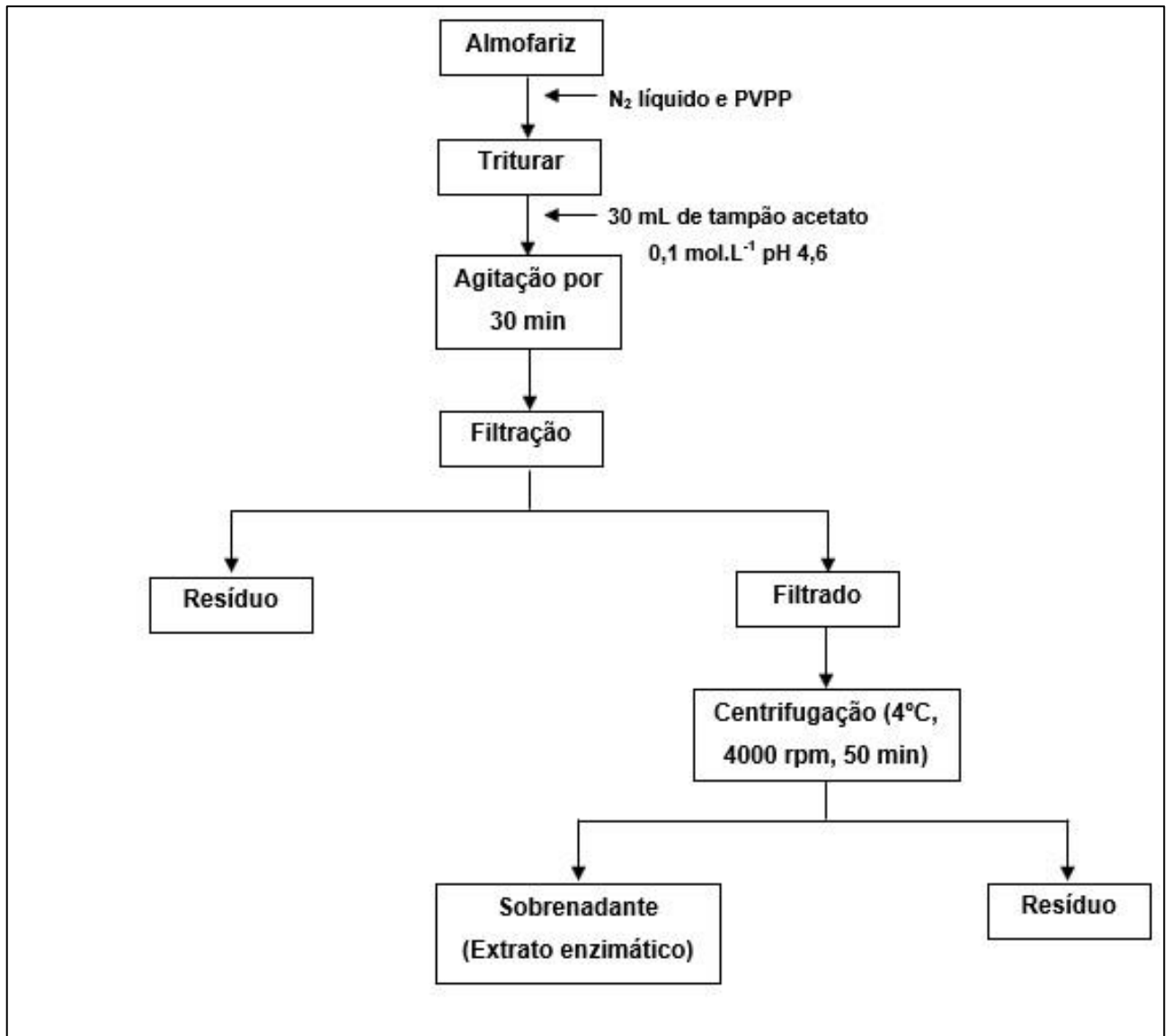
Os micélios de cada um dos fungos foram colocados em almofariz e em seguida, adicionou-se N₂ líquido para facilitar o rompimento do micélio (BONATO et al., 2014). Após essa etapa, foi adicionado 1 g de polivinilpolipirrolidona (PVPP) para auxiliar no processo de rompimento celular, para liberação das enzimas e prosseguiu-se com a maceração até se obter um pó fino e homogêneo. Finalizando o processo, foram adicionados no almofariz 30 mL de tampão acetato 0,1 mol.L⁻¹ pH 4,6 a frio e transferiu-se a mistura para um béquer de 250 mL.

O béquer foi então colocado em banho de gelo sob agitação por 30 minutos, com auxílio de um agitador magnético, a fim de realizar todo o procedimento sob baixa temperatura, para não ocorrer a desnaturação das enzimas (TORRES, 2001).

Após a agitação, o sistema foi filtrado com auxílio de um funil de vidro com gaze e o filtrado resultante foi transferido para um tubo Falcon de 50 mL. Centrifugou-se o filtrado sob rotação de 4000 rpm a 4 °C por 50 minutos, com o intuito de realizar a sedimentação da suspensão pela força da gravidade (KILIKIAN, 2005).

Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para outro tubo Falcon de 50 mL e armazenado em freezer -80 °C. O precipitado foi descartado. Todo o procedimento foi repetido para cada um dos fungos analisados.

Figura 20 - Fluxograma para preparo do extrato enzimático bruto



Fonte: Autor.

4.3.5 Análise qualitativa da produção de protease dos fungos isolados

Durante a avaliação da produção de proteases pelos fungos, foi realizada uma análise qualitativa para presença dessa classe de enzimas. Para isso, foi preparado um meio de cultura sólido conforme descrito por Saran e colaboradores (2007), com modificações.

Assim, foram preparados em Erlenmeyers, separadamente, soluções de leite desnatado (200 mL) 0,1 % (m/m), ágar bacteriológico (200 mL) 0,1 % (m/m) e 600 mL de tampão fosfato pH 7 (0,2 mol.L⁻¹). Todas as soluções foram autoclavadas separadamente durante 15 minutos a 2 atm para evitar a coagulação do leite em

presença do tampão utilizado. Após o processo de esterilização, as soluções foram misturadas em capela de fluxo laminar e, posteriormente, o meio foi transferido para placas de Petri esterilizadas e, após resfriamento, todos os fungos isolados foram inoculados separadamente nas mesmas.

Todas as placas foram incubadas a 30 °C durante 72 h em uma câmara climatizada para crescimento dos fungos e verificação da produção de proteases (SARAN; ISAR; SAXENA, 2007).

4.3.6 Determinação quantitativa da atividade proteolítica dos extratos enzimáticos brutos

O ensaio para quantificação da atividade proteolítica dos extratos enzimáticos brutos obtidos foi realizado de acordo com Charney e Tomarelli (1974), com modificações, conforme o fluxograma apresentado na Figura 21.

Para isso, inicialmente foram preparadas soluções de azocaseína 0,5% (m/v) diluída com tampão acetato pH 4,6, ácido tricloroacético (TCA) 10% (m/v) e KOH 0,5 mol.L⁻¹. Após essa etapa, todos os extratos enzimáticos foram submetidos a quantificação de proteases. Assim, as amostras foram preparadas pela adição de 1 mL de cada um dos extratos enzimáticos brutos separadamente e, em seguida, 1 mL da azocaseína.

Para cada uma das amostras foi preparado um branco, através da adição de 1 mL do extrato enzimático bruto, 1 mL de TCA e 1 mL de azocaseína. O branco das amostras foi necessário para se determinar a diferença de absorvância entre as amostras onde ocorreu hidrólise proteica com àquelas onde não ocorreu. O TCA teve a função de precipitar a azocaseína, interrompendo a reação.

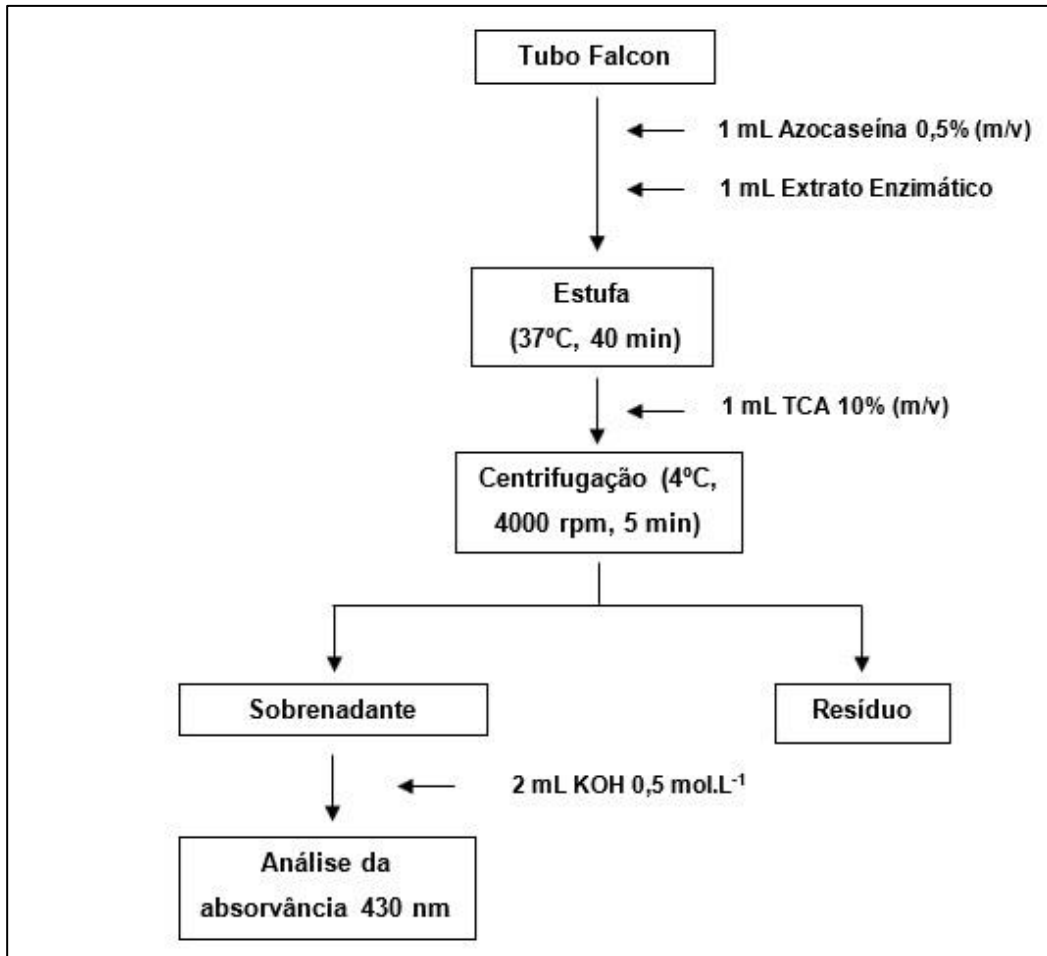
As reações foram realizadas em estufa a 37 °C por 40 minutos e, após esse período, foi adicionado imediatamente nos tubos de amostra 1 mL da solução de TCA para precipitar a azocaseína não hidrolisada e interromper a reação.

Após a adição do TCA, todos os tubos (tubos das amostras e tubos dos brancos) foram centrifugados a 4000 rpm a 4 °C por 5 minutos para precipitar a azocaseína que não foi hidrolisada. Logo após, foram coletados 2 mL do sobrenadante de todos os tubos e adicionou-se 2 mL de KOH.

Assim que o KOH é adicionado, o grupo Azo (grupo cromóforo) da azocaseína que foi hidrolisado devido à reação enzimática, apresenta uma cor laranja em pH

alcalino. O espectrofotômetro foi zerado com o tubo branco (preparado da mesma forma que as amostras com substituição do extrato enzimático por água). As amostras foram analisadas utilizando-se um comprimento de onda de 430 nm.

Figura 21 - Fluxograma para determinar a atividade proteolítica dos extratos enzimáticos



Fonte: Autor.

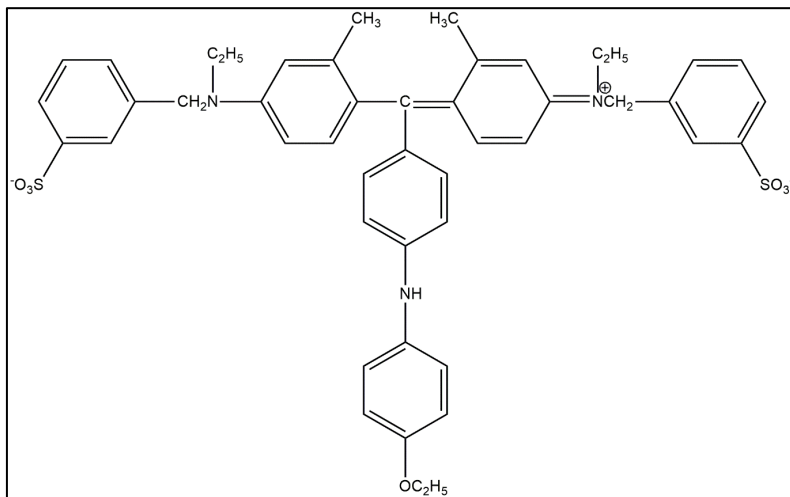
A atividade proteolítica do extrato sobre o substrato azocaseína, definida como a quantidade de enzima necessária para produzir um aumento na absorvância em relação ao branco igual a 0,01 por minuto de reação, foi expressa conforme equação 1:

$$\text{Atividade } \left(\frac{\text{U}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{Abs tubo amostra}_{430\text{nm}} - \text{Abs tubo branco amostra}_{430\text{nm}}}{\text{Tempo de reação (40 minutos)}} \quad (1)$$

4.3.7 Dosagem proteica das amostras

A determinação da concentração de proteínas foi realizada através do método adaptado de Bradford, muito utilizado devido a sua rapidez nos resultados. Dessa forma, de acordo com Compton e Jones (1985), esse método consiste na ligação das proteínas ao corante Coomassie Brilhante Blue G-250 (Figura 22), provocando a mudança de coloração da amostra, fazendo com que esta absorva a luz no comprimento de onda de 595 nm (COMPTON; JONES, 1985).

Figura 22 - Estrutura química do Coomassie Brilhante Blue G-250



Fonte: Autor "adaptado de" Compton e Jones, 1985

A concentração de proteínas em todos os extratos enzimáticos foi determinada utilizando-se este método, sendo essa determinação realizada utilizando-se 0,8 mL de cada extrato enzimático, 0,8 mL de água destilada e 2,4 mL de reagente de Bradford. Após esse processo, todas as absorvâncias foram determinadas em 595 nm, em duplicata. Diluições foram realizadas, quando necessário, para determinação das concentrações proteicas de cada amostra.

Cabe ressaltar que, para a determinação da concentração proteica existente em cada amostra, foi obtida uma curva de calibração utilizando-se como padrão albumina bovina. Para isso, uma solução padrão $0,2 \text{ mg.mL}^{-1}$ foi preparada e diluída em concentrações consecutivas (Apêndice A) sendo as absorvâncias determinadas a 595 nm.

4.3.8 Seleção dos fungos que mostraram maior atividade proteolítica

Para definir a atividade proteolítica específica de cada fungo, foi realizada uma divisão entre os resultados obtidos do item 4.3.6 (atividade por mL) pelos resultados obtidos do item 4.3.7 (dosagem proteica), de acordo com a equação 2:

$$\text{Atividade específica} \left(\frac{\text{U}}{\text{mg de proteínas}} \right) = \frac{\text{Atividade} \left(\frac{\text{U}}{\text{mL}} \right)}{\text{Concentração proteínas} \left(\frac{\text{mg de proteínas}}{\text{mL}} \right)} \quad (2)$$

4.3.9 Extração das frações proteicas da farinha de trigo

O método de extração das frações proteicas da farinha de trigo se deu de acordo com Shomer e colaboradores (1995 e 1998), com modificações, conforme ilustrado na Figura 23.

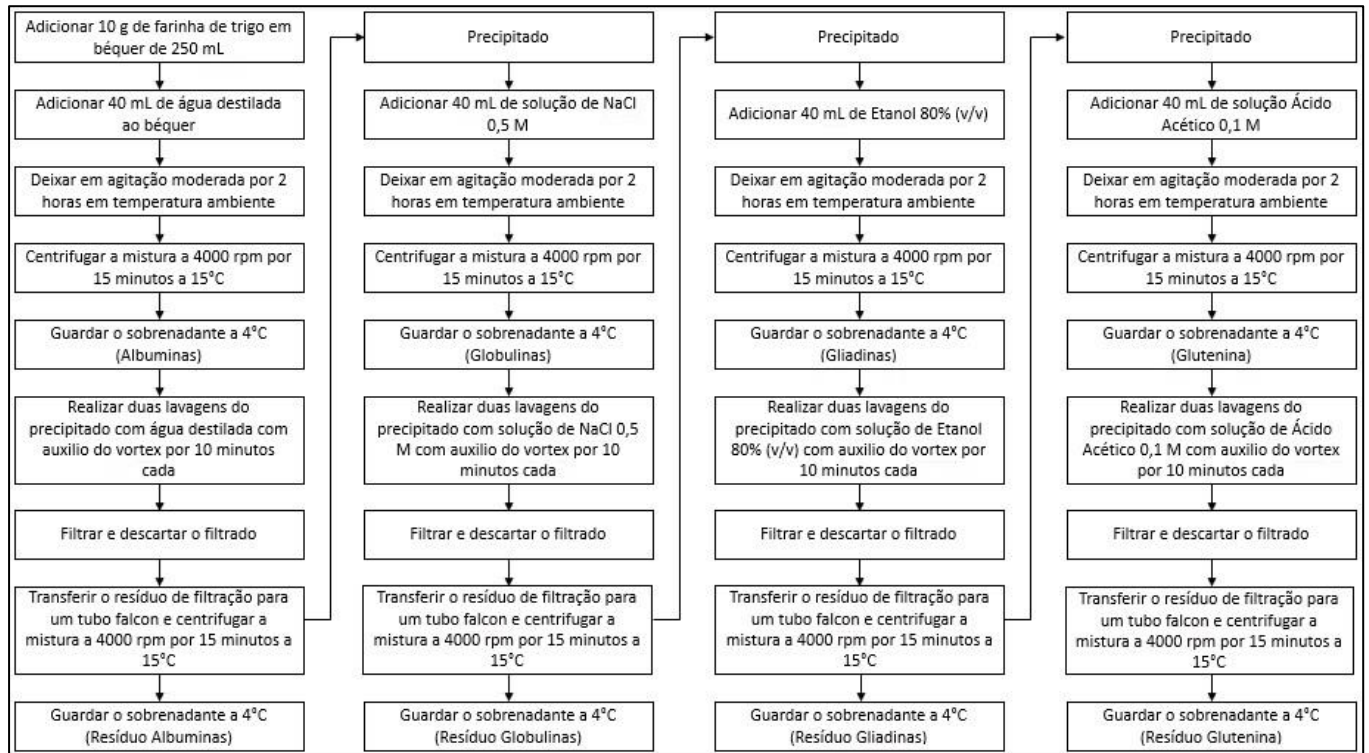
Para tanto, pesou-se 10 g de farinha de trigo em um béquer de 250 mL e adicionou-se à mesma 40 mL de água, deixando essa mistura sob agitação moderada (100 rpm) por 2 horas à temperatura ambiente, com o intuito de promover maior extração das proteínas solúveis em água, as albuminas. Finalizada essa etapa, a solução foi transferida para um tubo Falcon de 50 mL e centrifugada a 4000 rpm, por 15 minutos a 15 °C. O sobrenadante (albuminas) foi transferido para outro tubo Falcon e armazenado a 4 °C.

Para garantir que houve extração das albuminas, o precipitado da centrifugação foi adicionado ao Vortex e agitado em alta rotação com água destilada. Após a agitação, foi realizada uma filtração com filtro de nylon de alta porosidade e o filtrado, descartado. Repetiu-se o processo novamente até a etapa de filtração.

Feita a última filtração, o resíduo foi colocado em tubo Falcon e centrifugado a 4000 rpm, por 15 minutos a 15 °C. O sobrenadante (resíduo albumina) foi transferido para outro tubo Falcon e armazenado a 4 °C.

Com o precipitado da última centrifugação repetiu-se o mesmo processo como descrito anteriormente, somente trocando o solvente de extração, sendo NaCl 0,5 mol.L⁻¹ para globulinas, etanol 80% (v/v) para gliadinas e, ácido acético 0,1 mol.L⁻¹ para gluteninas.

Figura 23 - Fluxograma para extração das frações proteicas da farinha de trigo



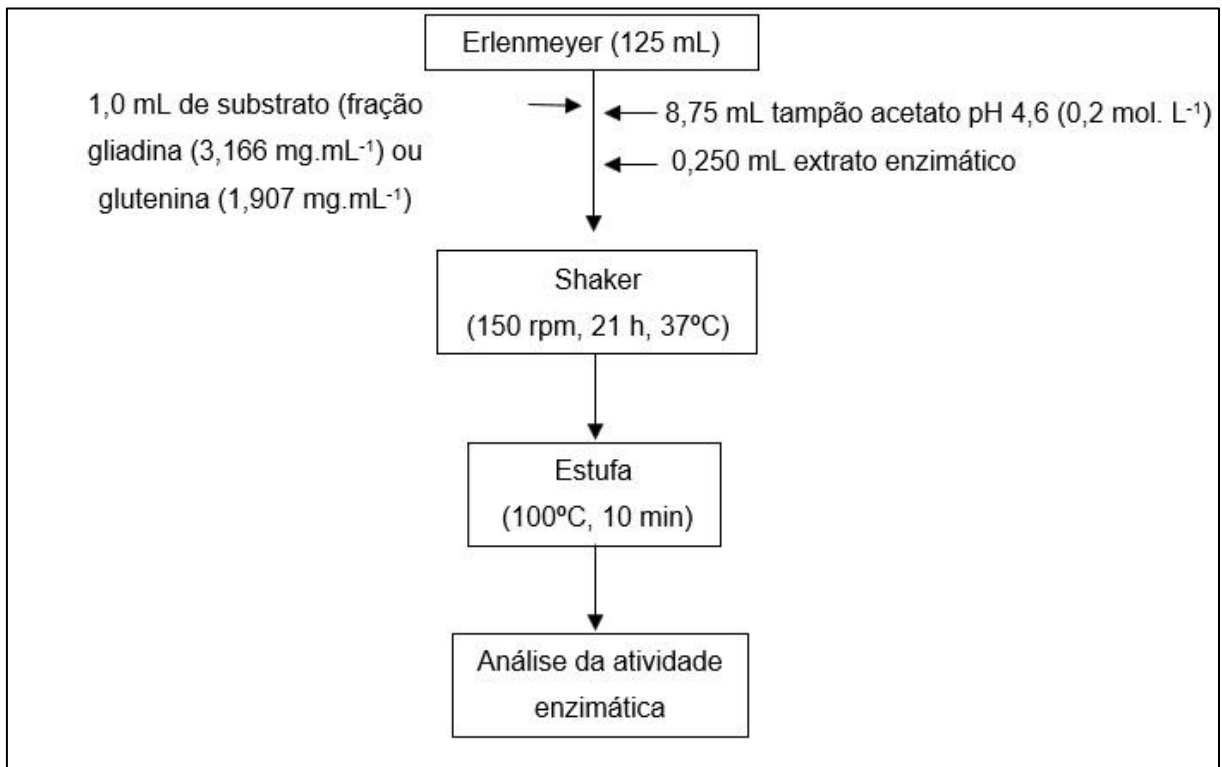
Fonte: Autor.

Todas as frações proteicas de farinha de trigo obtidas foram quantificadas utilizando-se o método de Bradford conforme descrito.

4.3.10 Reação de hidrólise da gliadina e glutenina a partir dos extratos enzimáticos bruto selecionados

Os fungos que mostraram maior atividade de protease foram submetidos à reação, a fim de verificar a presença de proteases específicas para hidrólise das frações obtidas a partir da farinha de trigo. Para isso, foi realizada a reação de hidrólise das frações de gliadina e glutenina obtidas no item 4.3.9, a fim de determinar qual dos fungos previamente selecionados possuía maior capacidade de hidrólise dos principais componentes do glúten. As reações foram realizadas em pH 4,6 a 37 °C (Figura 24).

Figura 24 - Fluxograma de reação de hidrólise da gliadina e glutenina



Fonte: Autor.

Durante as determinações das atividades, foi realizado um teste branco dos extratos enzimáticos brutos, bem como brancos da gliadina e glutenina. Assim, para a obtenção do branco da glutenina ou gliadina foi adicionado nos Erlenmeyers 1 mL dos substratos obtidos e o volume completado com 9 mL de tampão acetato 0,2 M pH

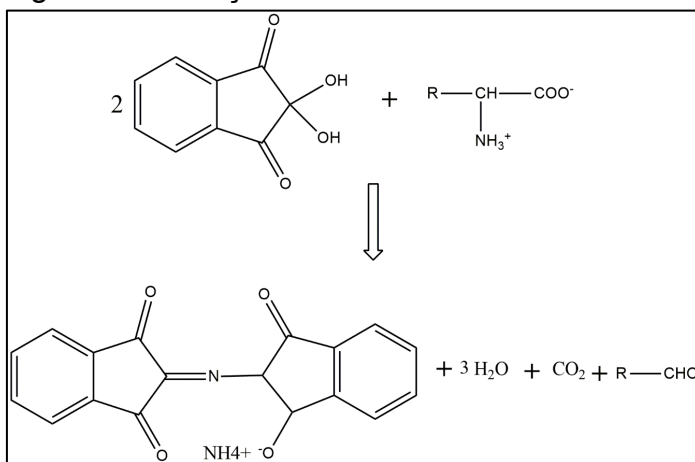
4,6. Os substrato gliadina e glutenina possuem uma concentração média de proteínas de 3,166 mg.mL⁻¹ e 1,907 mg.mL⁻¹, respectivamente.

A mistura foi submetida a agitação em shaker nas mesmas condições descritas anteriormente. Já para a obtenção dos brancos de cada extrato enzimático, foram adicionados, separadamente, em Erlenmeyers, 250 µL do extrato enzimático junto com 9,75 mL de tampão aceto 0,2 M de pH 4,6, sendo a mistura submetida a agitação em shaker nas mesmas condições descritas anteriormente.

Após as 21 horas de reação, os Erlenmeyers foram deixados em estufa a 100 °C por 10 minutos, para desnaturar as enzimas e parar a reação. Logo após essa etapa, o conteúdo dos Erlenmeyers foi analisado de acordo com a metodologia descrita por Toro e García-Carreño (2002), com modificações.

Assim, para confirmar a hidrólise e avaliar a quantidade de gliadina e glutenina que foi hidrolisada, foi utilizada uma solução etanólica de ninidrina 2% (m/v), para confirmar a presença de amins primárias de acordo com a Figura 25.

Figura 25 - Reação da ninidrina com aminoácido



Fonte: Autor "adaptado de" Toro e García-Carreño, 2002

Quando a ninidrina reage com uma amina primária, a coloração do meio se torna roxa azulada, confirmando a presença de aminoácidos livres no meio. O único aminoácido que ao reagir com a ninidrina não torna o meio roxo azulado é a prolina e a hidroxiprolina, que tornam o meio amarelo (TORO; GARCÍA-CARREÑO, 2002).

Assim, para quantificar o quanto foi hidrolisado de cada substrato, foi obtida uma curva de calibração utilizando-se soluções de *L*-leucina com concentrações conhecidas (0,1 mg.mL⁻¹ a 0,02 mg.mL⁻¹), conforme proposto por Toro e García-Carreño (2002) e suas absorvâncias foram determinadas no comprimento de onda de

570 nm (Apêndice B). O branco para zerar o espectrofotômetro foi composto de 2 mL de água destilada e 2 mL de solução alcoólica de ninidrina 2% (m/v).

A quantidade de 2 mL de todas as amostras, incluindo os brancos e padrões, foi adicionada em tubos de ensaio e, logo em seguida, adicionou-se 2 mL de solução alcoólica de ninidrina 2% (m/v). Os tubos de ensaio foram colocados para aquecer em estufa a 100 °C por 10 minutos e, logo após, resfriados a temperatura ambiente, sendo as absorvâncias determinadas em 570 nm.

Para realização do cálculo da quantidade de aminoácidos livres no hidrolisado, foram realizados brancos dos substratos e dos extratos enzimáticos utilizados, cujos valores foram descontados e, a partir dos dados obtidos, foi selecionado o fungo que mais hidrolisou a gliadina e a glutenina (CA6), que foi utilizado durante as demais etapas, a partir da concentração de aminoácidos em $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

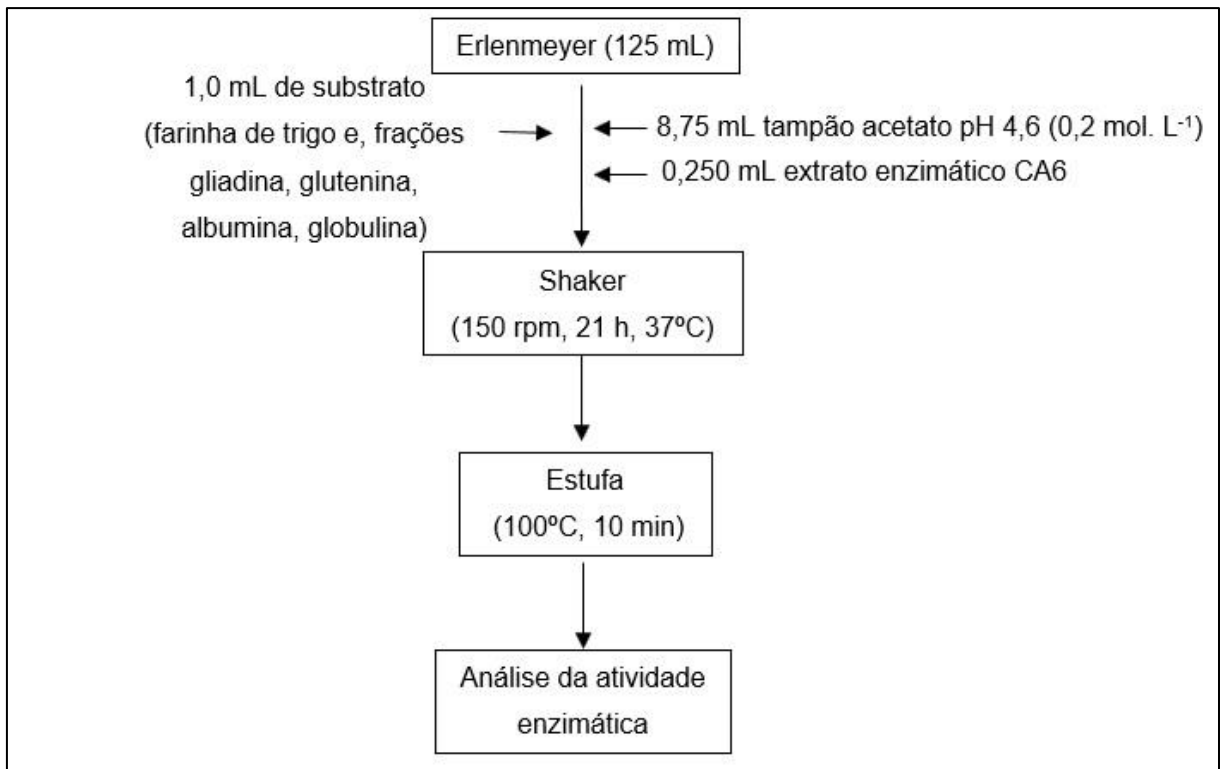
4.3.11 Hidrólise da farinha de trigo e de suas frações com o extrato enzimático CA6

Selecionado o fungo mais eficiente (CA6), foi preparada uma solução aquosa de farinha de trigo com concentração $0,25 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$, diluindo-se a mesma em tampão acetato 0,2 M pH 4,6. Os substratos albumina, globulina, gliadina e glutenina possuem uma concentração de proteínas de $2,289 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, $1,336 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, $3,166 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e $1,907 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente.

Após essa etapa, a solução de farinha de trigo foi colocada para reagir com o extrato enzimático bruto selecionado. Para realizar uma prova, todas as outras frações da farinha de trigo obtidas também foram colocadas para reagir com o extrato enzimáticos bruto selecionado, conforme Figura 26.

Todos os meios reacionais foram preparados conforme metodologia descrita no item 4.3.10 e analisadas através da metodologia da ninidrina.

Figura 26 - Fluxograma de reação de hidrólise da farinha de trigo e suas frações



Fonte: Autor.

4.3.12 Preparo do meio líquido para crescimento do fungo selecionado

Para se estudar a influência do pH na produção das enzimas proteolíticas pelo fungo selecionado, foi preparado um meio de cultura líquido nos pH's 2, 3, 4, 5, 6, 8 e, 10.

Para cada pH foi preparado um tampão, de acordo com a Tabela 11:

Tabela 11 - Tampões utilizados para cada pH

pH	Tampão
2	Cloreto de Potássio-Acido Clorídrico
3	Citrato-Fosfato
4	Citrato-Fosfato
5	Citrato-Fosfato
6	Citrato-Fosfato
8	Fosfato
10	Carbonato

Fonte: Autor.

O meio de cultura foi preparado de acordo com a composição apresentada na Tabela 12:

Tabela 12 - Composição do meio

Reagente do meio	Composição % (m/v)
KH ₂ PO ₄	0,20
NaH ₂ PO ₄	0,80
MgSO ₄	0,25
Peptona	2,00
Extrato de Levedura	1,00
Glicose	2,00

Fonte: Autor.

Os meios de cultura foram preparados em 7 Erlenmeyers de 250 mL cada, adicionando-se cada reagente do meio na composição indicada na Tabela 12 e posteriormente misturados com 100 mL de tampão da tabela 11.

Todos os meios de cultura foram autoclavados durante 15 minutos a 2 atm para esterilização e, após essa etapa, adicionou-se ao meio de cultura uma concentração de 30 µg.mL⁻¹ de antibiótico (sulfato de gentamicina), a fim de evitar o crescimento de bactérias.

Após essa etapa, foram inoculados pedaços de aproximadamente 1x1 cm de diâmetro do fungo em cada Erlenmeyer em capela de fluxo laminar e deixados sob agitação em Shaker a 28 °C em 115 rpm por 5 dias.

Após os 5 dias de crescimento dos fungos, os sistemas foram filtrados. O filtrado, rico em enzimas que foram secretadas ao meio foram armazenados (extrato externo). Os fungos foram submetidos à extração das enzimas, utilizando-se a metodologia descrita no item 4.3.4 (extrato interno). Com isso, foram obtidos os extratos enzimáticos nos pH's 2, 3, 4, 5, 6, 8 e 10.

4.3.13 Hidrólise da farinha de trigo com o fungo crescido em diferentes pHs

Visando identificar qual pH do meio de crescimento favoreceu a produção da enzima de interesse, 250 µL de cada extrato (extrato externo e interno) foram utilizados para reagir por 21 horas a 37 °C, com 1000 µL de solução de farinha de

trigo de concentração $0,25 \text{ g.mL}^{-1}$, junto com $8750 \text{ }\mu\text{L}$ de tampão acetato $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ de pH 4,6. O procedimento de análise foi realizado conforme o item 4.3.10.

A partir da análise, identificou-se e selecionou-se o melhor pH do meio de cultivo para a produção da enzima de interesse e esse meio foi utilizado para determinação das condições reacionais ideais, bem como durante a etapa de pré purificação da protease de interesse (extrato enzimático obtido a partir do fungo que foi submetido ao crescimento em meio líquido).

4.3.14 Determinação do tempo e pH ideais

Para determinação do tempo de hidrólise ideal da farinha de trigo, $250 \text{ }\mu\text{L}$ de extrato enzimático bruto CA6 selecionado anteriormente foram submetidos à reação de hidrólise por intervalos de tempos diferentes. Cada reação foi realizada utilizando-se $1000 \text{ }\mu\text{L}$ de solução de farinha de trigo de concentração $0,25 \text{ g.mL}^{-1}$ e $8750 \text{ }\mu\text{L}$ de tampão acetato $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ de pH 4,6. O procedimento de análise foi realizado conforme descrito no item 4.3.10.

Visando a identificação do pH que favorece a hidrólise da farinha de trigo, $250 \text{ }\mu\text{L}$ de extrato enzimático bruto CA6 selecionado foram colocados para reagir com $1000 \text{ }\mu\text{L}$ de solução de farinha de trigo de concentração $0,25 \text{ g.mL}^{-1}$ e $8750 \text{ }\mu\text{L}$ de tampões de diferentes pH's, sendo eles: tampão cloreto de potássio-ácido clorídrico (pH 2) e tampão citrato-fosfato (pH 3, pH 4 e pH 5). As reações foram processadas por 21 horas, a $37 \text{ }^\circ\text{C}$. O procedimento de análise foi realizado conforme o item 4.3.10.

4.3.15 Precipitação salina do extrato enzimático bruto

Durante a etapa de pré-purificação do extrato enzimático bruto selecionado (CA6 submetido ao crescimento em meio líquido, pH 3), foi realizada a precipitação salina.

Adicionou-se sulfato de amônio para se atingir as saturações sequenciais de 25, 50, 75%. A quantidade de sulfato de amônio a ser adicionada para se atingir cada uma das saturações desejadas foi determinada utilizando-se a tabela descrita por England e Seifter (1990).

Assim, inicialmente adicionou-se sulfato de amônio em quantidade suficiente para se atingir a saturação de 25%. O sal foi adicionado lentamente ao extrato

enzimático e, posteriormente, a mistura foi mantida sob agitação por 30 minutos a 4 °C. Após essa etapa, o extrato foi centrifugado a 4.000 rpm por 60 minutos, o precipitado congelado a -80 °C e o sobrenadante levado a 50% de saturação e, assim, sucessivamente, até obter-se as demais concentrações desejadas.

Todas as frações obtidas bem como o sobrenadante residual após saturação com 75 % de sulfato de amônio foram analisadas para verificação da saturação que proporcionou a maior concentração das proteases de interesse. Para isso, cada fração foi solubilizada em 2 mL de tampão acetato pH 4,6 e 250 µL dessa solução obtida foi colocado para reagir com 1000 µL de solução de farinha de trigo de concentração 0,25 g.mL⁻¹ e 8750 µL de tampão acetato 0,2 M pH 4,6. Todas as misturas reacionais foram analisadas conforme metodologia descrita no item 4.3.10.

4.3.16 Eletroforese

As frações obtidas após a precipitação salina também foram analisadas via eletroforese em gel de poliacrilamida. Porém, para a realização dessa análise, foi necessária a dessalinização das amostras. Para isso, as frações foram ressuspensas em 2,5 mL de tampão acetato 0,2 mol.L⁻¹ pH 4,6 e eluídas através de uma coluna PD10. A coluna foi equilibrada com 2,5 mL do mesmo tampão e, posteriormente, foram adicionados 2,5 mL da solução a ser dessalinizada e a eluição foi feita com 3,5 mL de tampão.

Após a dessalinização, os extratos foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5 %. O padrão que continham enzimas conhecidas foi também aplicado no mesmo gel (Tabela 13).

Tabela 13 - Enzimas presentes no padrão (LMW-SDS Marker Kit) utilizado

Enzimas	Pesos moleculares (daltons)
Fosforilase b	97.400
Albumina sérica	66.200
Ovoalbumina	45.000
Anidrase carbônica	31.000
Inibidora de tripsina	21.500
α-lactalbumina	14.437

Fonte: Autor.

O tampão utilizado durante a realização da corrida foi o TRIS/glicina, onde adicionou-se SDS. Já para preparo das amostras, foi realizada a solubilização das mesmas e também do padrão peso molecular em um tampão composto por 0,6 mL de tampão TRIS/HCl 1 mol.L⁻¹ pH 6,8, 5 mL de uma solução de glicerina 50 %, 2 mL de SDS 10 %, 0,5 mL de 2-mercaptoetanol, 1 mL de azul de bromofenol 1 % e 0,9 mL de água. Todas as amostras foram solubilizadas utilizando-se uma proporção de 4:1 (amostra:tampão), submetidas ao aquecimento por 5 minutos a 100 °C e centrifugadas a 4000 rpm, antes da aplicação no gel.

No gel foram aplicados 15 µL de cada amostra, sendo a corrida realizada utilizando-se uma corrente de 20 mA e uma voltagem de 120 V. Quando a corrida atingiu o final do gel, a fonte foi desligada, o gel foi retirado do suporte e iniciou-se o processo de revelação do gel utilizando-se as etapas descritas na Tabela 14.

Tabela 14 - Etapas para revelação do gel através do método de Blum, Bier e Gross

Etapas	Tempo
Fixador (metanol 50 %, ácido acético 12%, água até completar 100 mL)	"Over night"
Lavar com água deionizada	5 min (4X)
DTT - Ditioneitol (1mg em 200mL de água)	20 min
Nitrato de prata 0,2 %	20 min
Lavar com água deionizada	10 seg (3X)
Revelação (50 µL Formaldeído + 3g de Carbonato de Sódio + Água até completar 100mL)	
Interromper a revelação com Ácido Acético Glacial 5%	

Fonte: Autor.

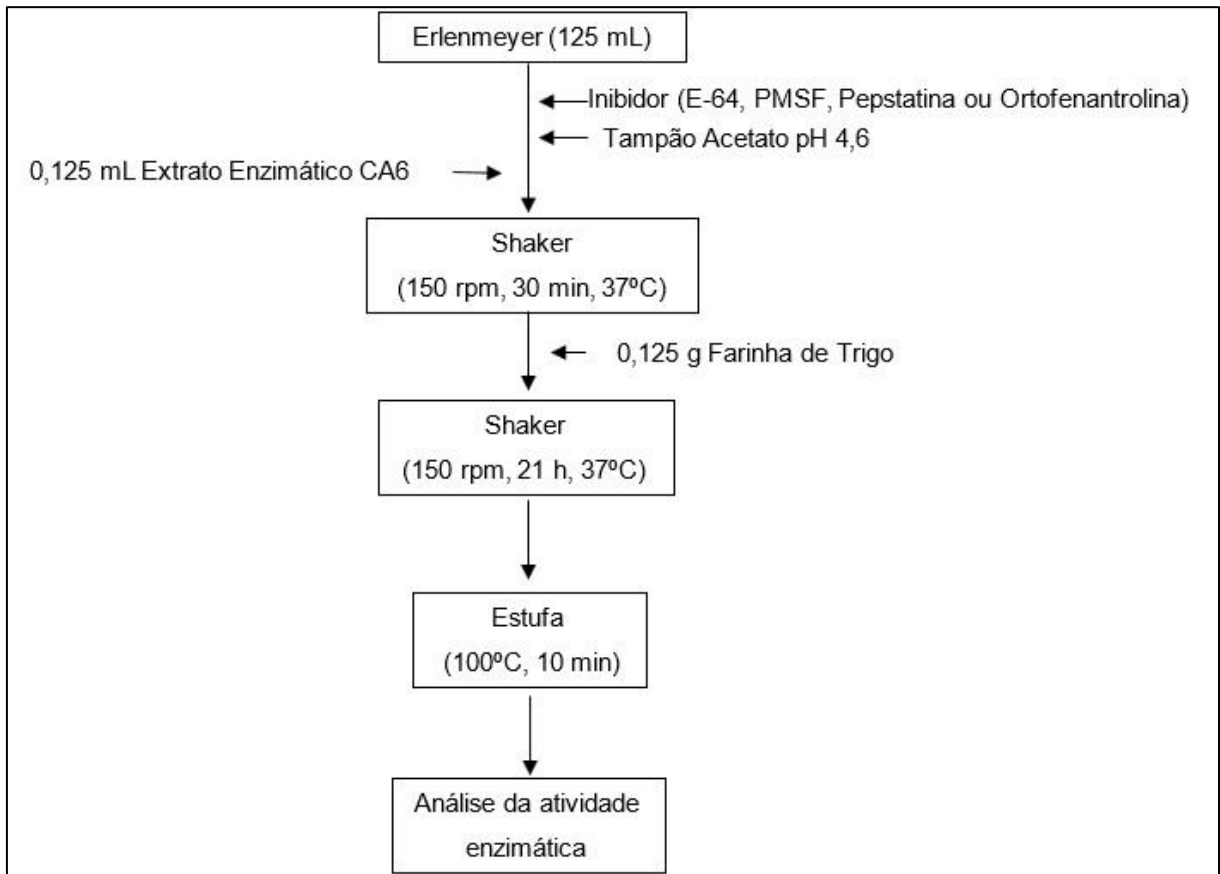
Após a revelação do gel foi determinada a possível massa molecular das proteases responsáveis pela hidrólise do glúten.

4.3.17 Avaliação do efeito de inibidores na atividade enzimática

Durante o desenvolvimento do presente trabalho, o efeito de inibidores relacionados a proteases específicas ligadas à digestão do glúten foi avaliado. Para isso, utilizou-se os seguintes inibidores: E64 - trans-epoxisuccinil-L-leucilamido(4-guanidino)butano 10 µM (inibidor de cisteíno proteases), pepstatina A 1 µM (inibidor de aspartil proteases); PMSF – fluoreto de fenilmetilsulfonila 1 mM (inibidor de serino

proteases) e, ortofenantrolina 10 mM (inibidor de metaloproteases). A metodologia de preparo dos inibidores foi realizada de acordo com Bersanetti e colaboradores (2005), com modificações, conforme o fluxograma apresentado na Figura 27.

Figura 27 - Fluxograma para avaliação dos efeitos dos inibidores



Fonte: Autor.

Foram separados 5 Erlenmeyers de 125 mL cada para os 4 inibidores e um branco, onde foram adicionadas as quantidades de inibidores, tampão acetato pH 4,6 e extrato enzimático CA6 até a solução obter 5 mL de volume final, conforme a Tabela 15.

Adicionou-se ao Erlenmeyer contendo os inibidores e o tampão, 0,125 mL de extrato enzimático CA6. O sistema foi então colocado sob agitação em shaker a 150 rpm por 30 minutos a 37 °C. Após essa etapa, foram adicionados em cada Erlenmeyer 0,125 g de farinha de trigo e a mistura foi colocada novamente em shaker a 150 rpm por 21 horas a 37 °C. Finalizada a reação, os Erlenmeyers foram colocados em estufa

a 100 °C, com o objetivo de inativar a enzima, e os materiais foram analisados conforme descrito no item 4.3.10.

Tabela 15 - Concentração de cada reagente

Inibidor	Concentração Inibidor (Mol/L)	Volume de tampão utilizado (mL)	Volume extrato enzimático (mL)
Branco	-	4,875	0,125
E-64	$10 \cdot 10^{-6}$	4,857	0,125
PMSF	$1 \cdot 10^{-3}$	4,85	0,125
Pepstatina	$1 \cdot 10^{-6}$	4,87	0,125
Ortofenantrolina	$10 \cdot 10^{-3}$	4,625	0,125

Fonte: Autor.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nos itens 5.1 até 5.9 estão descritos os resultados obtidos durante o desenvolvimento do presente trabalho.

5.1 PURIFICAÇÃO DOS FUNGOS E IDENTIFICAÇÃO

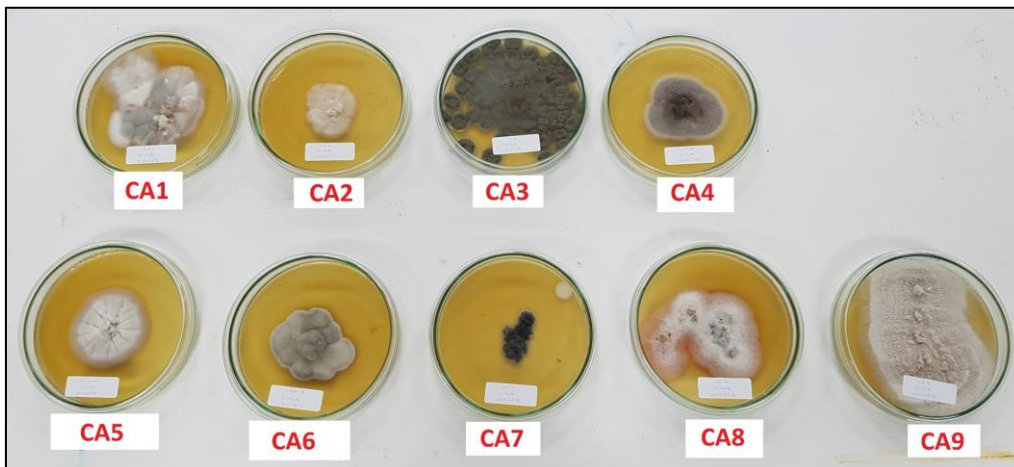
Durante o desenvolvimento do presente trabalho, foi realizado o plaqueamento dos caules e folhas da mandioca, visando a obtenção dos fungos associados à espécie. Analisando as placas após 10 dias, foi possível verificar a presença de várias colônias impuras (Figura 28), que foram submetidas à repiques consecutivos em meio BDA para a purificação dos fungos. Ao total, foram obtidos 14 fungos: 9 fungos a partir dos caules (Figura 29) e 5 fungos a partir das folhas (Figura 30).

Figura 28 - Colônias Impuras



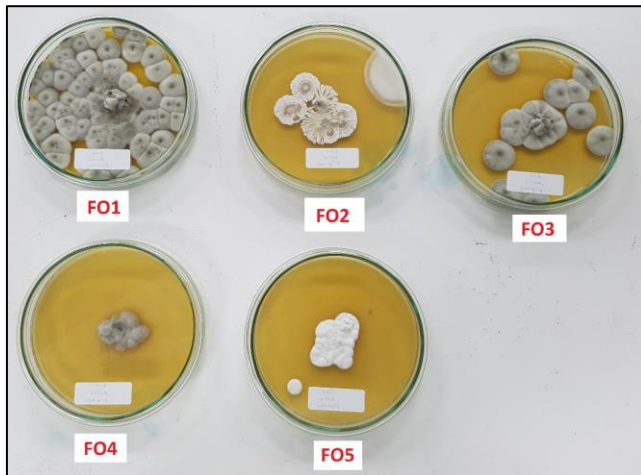
Fonte: Autor.

Figura 29 - Fungos obtidos do caule da mandioca



Fonte: Autor.

Figura 30 - Fungos obtidos da folha da mandioca



Fonte: Autor.

Todos os fungos foram encaminhados para a identificação pelo sequenciamento de DNA (Tabela 16), sendo encontradas 11 culturas de fungos diferentes.

Tabela 16 - Resultado de genotipagem de cada amostra de fungo

Descrição	Fungo identificado
CA1	<i>Microdochium lycopodium</i>
CA2	<i>Colletotrichum</i> sp
CA3	<i>Cladosporium</i> sp
CA4	<i>Colletotrichum brevisporum</i>
CA5	<i>Microdochium lycopodium</i>
CA6	<i>Alternaria</i> sp
CA7	<i>Phyllosticta elongata</i>
CA8	<i>Colletotrichum</i> sp
CA9	<i>Phomopsis</i> sp
FO1	<i>Cladosporium xanthochromaticum</i>
FO2	<i>Xylaria</i> sp
FO3	<i>Cladosporium xanthochromaticum</i>
FO4	<i>Phaeosphaeria podocarp</i>
FO5	<i>Peniophora</i> sp

Fonte: Autor.

Muitos dos fungos isolados nas amostras de caule e de folhas da mandioca já foram encontrados associados a plantas e frutos. Como exemplos, fungos do gênero *Alternaria* já foram isolados da fruta oxicoco (STILES; OUDEMANS, 1999), farinha de

mandioca, e farinha de milho (LEMOS et al., 2007). *Xylaria* já foi isolada da hortelã-gorda (*Coleus aromaticus*) e cafezinho (*Palicourea marcgravii*) (AMIRITA et al., 2012). *Phomopsis* e *Colletotrichum* já foram encontradas em plantas medicinais como boldo-do-chile (*Vernonia condensata*), romã (*Punica granatum*) e amora-negra (*Morus nigra*) (MUSSI-DIAS et al., 2012). Já, *Cladosporium* já foi isolado de amostra comercial de farinha de mandioca e de farinha de milho (LEMOS et al., 2007) e em grãos verdes de café (*Coffea arábica* L.) (ROLDÃO; PFENNING, 2001).

É importante salientar também que, muitas doenças podem ser potencializadas pela presença de fungos associados a espécies vegetais. Um exemplo é a murcha, doença causada pelo *Bacillus manihotis* que ocorre na mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), que pode ter seu efeito potencializado caso o fungo *Colletotrichum* sp invada os tecidos danificados da planta (KIMATI et al., 1997).

Assim, se torna importante a caracterização dos fungos associados a mandioca visando um estudo do seu potencial biotecnológico na hidrólise do glúten.

5.2 ENSAIO QUALITATIVO DOS FUNGOS PRODUTORES DE PROTEASE

Os fungos considerados produtores de protease são os fungos que apresentam um halo mais intenso, na coloração marrom, ao aplicar uma solução de 10% de TCA como solução reveladora em volta do fungo, conforme descrito por Saran e colaboradores (2007) (Figura 31). O TCA desnatura as proteínas do leite, fazendo com que o ágar, que não foi consumido pela enzima, fique mais evidente.

Figura 31 - Halo formado pela presença de proteases

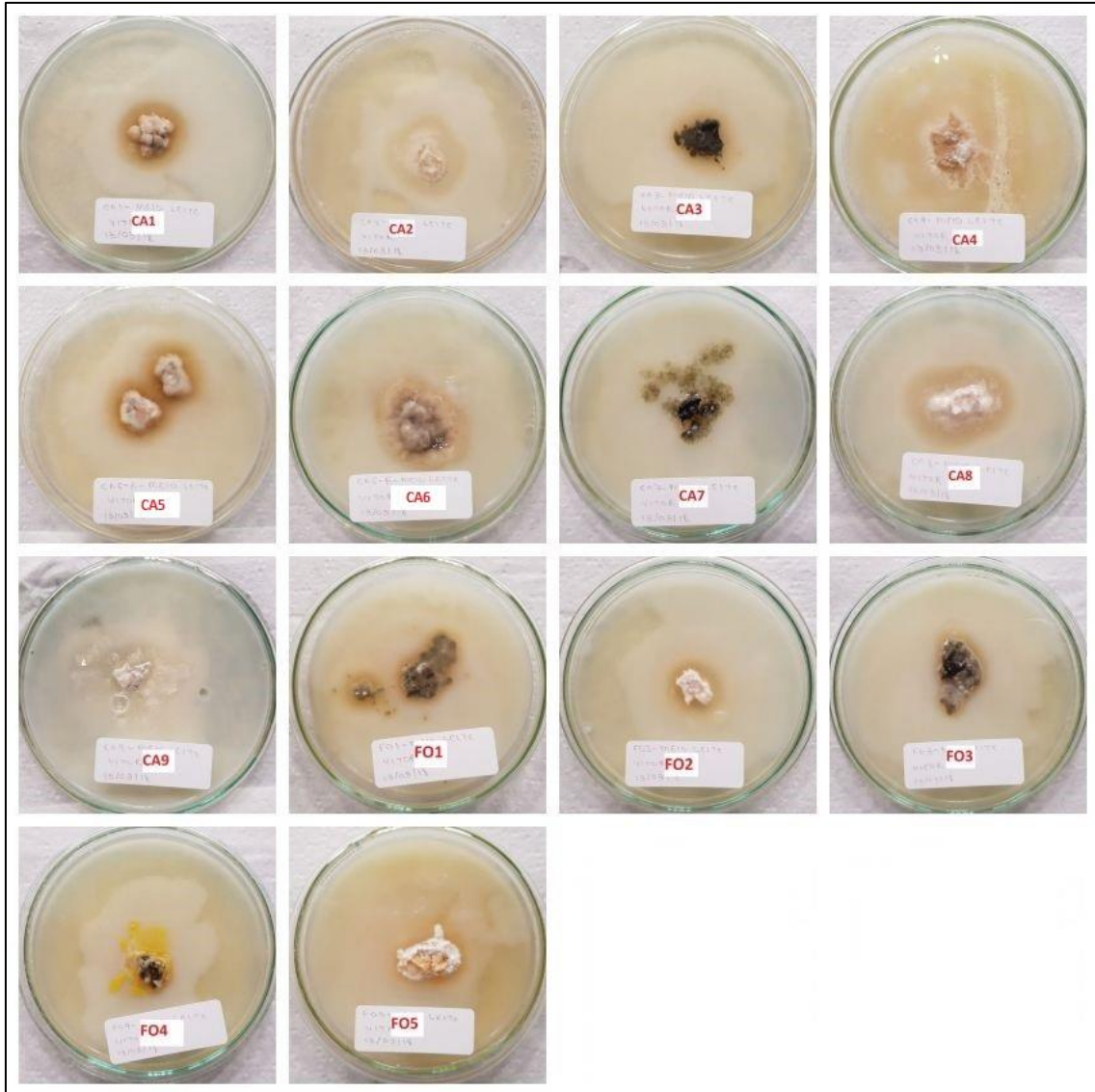


Fonte: Autor “adaptado de” Saran, Isar e Saxena, 2007

Após a purificação e identificação dos fungos isolados a partir dos caules e folhas de mandioca, foi realizado um teste qualitativo para verificação da produção de proteases extracelulares por esses fungos, que foram colocados em meio ágar-leite,

a 30 °C por 72 horas. Na Figura 32 encontram-se disponíveis todos os perfis dos fungos incubados em meio ágar-leite, demonstrando seus halos.

Figura 32 - Fungos crescidos em meio ágar-leite



Fonte: Autor.

Visando auxiliar na compreensão dos resultados, na Tabela 17 é apresentado um resumo mostrando quais fungos foram considerados produtores de proteases no teste qualitativo:

Tabela 17 - Fungos produtores de protease

Fungo	Teste
CA1	+
CA2	-
CA3	+
CA4	-
CA5	+
CA6	+
CA7	-
CA8	+
CA9	-
FO1	+
FO2	+
FO3	+
FO4	-
FO5	+

Fonte: Autor.

Em estudos realizados por Werneck (2016), foram isolados fungos de plantas do cerrado brasileiro (*Sapindus saponária* L., *Morus nigra* L., *Calophyllum brasiliense*, *Eriotheca pubescens*, *Ouratea hexasperma*, *Dalbergia miscolobium*, *Pouteria torta*, *Stryphnodendron adstringens*, *Kielmeyera coriacea*, *Solanum lycocarpum*, *Caryocar brasiliensis*, *Tabebuia ochracea*, *Psidium guajava* L.) produtores de protease. No teste, para confirmar a produção de proteases pelos fungos, o mesmo utilizou o meio agar-leite, onde foram identificados 36 fungos produtores de protease, de um total de 58.

Estudos realizados por Rodarte e colaboradores (2011) encontraram 66 fungos filamentosos do grão de café (*Coffea arábica*), onde 50% deles eram fungos que excretavam protease para o meio. O teste também foi realizado em meio contendo caseína, glucose e ágar.

Outro estudo envolvendo a técnica de cultivo de fungos em meio ágar-leite foi feita por Orlandelli e colaboradores (2015), em que foram isolados 98 fungos endofíticos de folhas de *Piper hispidum* sendo encontrados espécies de *Alternaria* sp e *Colletotrichum* sp. De acordo com o estudo, quanto maior o diâmetro do halo formado em volta do fungo, maior a capacidade do mesmo de produzir proteases. Para esses dois fungos, foram produzidos halos de 6 mm para *Alternaria* sp e de 3,6 mm para *Colletotrichum* sp.

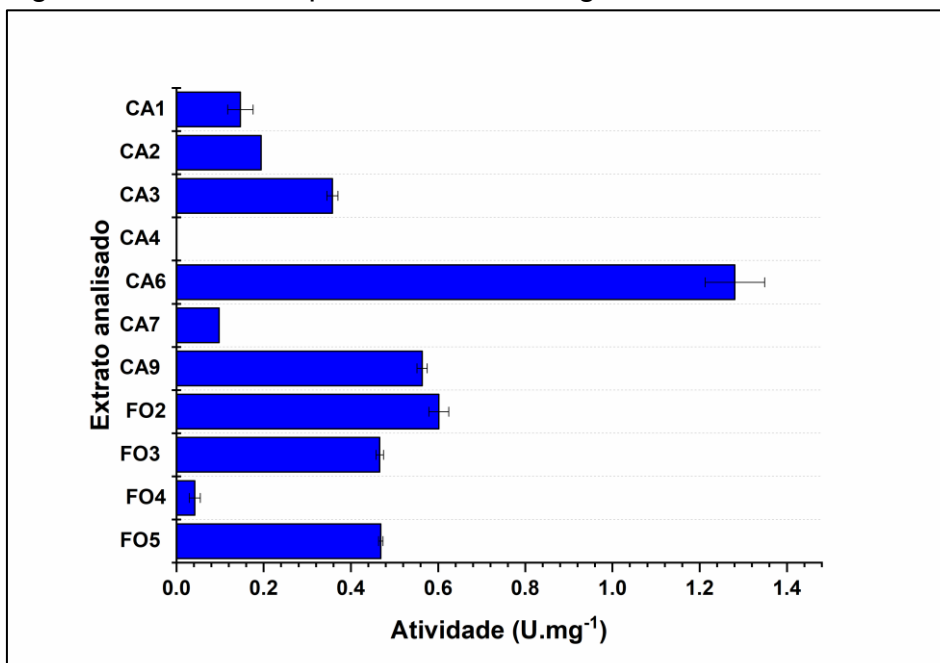
5.3 ENSAIO QUANTITATIVO DOS FUNGOS PRODUTORES DE PROTEASE

De acordo com o resultado obtido no ensaio qualitativo para classificar os fungos como produtores de protease, os fungos FO4, CA9, CA7, CA4 e CA2 não foram considerados fungos produtores de protease secretada, uma vez que não formaram halo em volta da colonia. Porém, nesse ensaio qualitativo, deve ser levado em consideração apenas que esses fungos não possuem capacidade de secretar proteases para o meio.

Também não foi levado em conta qual fungo produz o halo de maior intensidade. Dessa forma, neste novo ensaio realizado, determinou-se qual fungo foi capaz de produzir proteases e, também, qual deles apresentou maior atividade.

Assim, visando a avaliação quantitativa da produção de proteases dos 11 diferentes fungos encontrados na folha e caule da mandioca, foram obtidos extratos enzimáticos dos mesmos após a maceração e a atividade proteolítica (U) por mL de extrato foi determinada (Apêndice C). Também foi realizada a dosagem proteica de cada extrato em mg de proteína por mL de extrato (Apêndice D), todos em duplicata. Com os resultados obtidos, foi possível a determinação da atividade proteolítica (U) por mg de proteína de cada extrato (Figura 33).

Figura 33 - Atividade proteolítica dos fungos associados a mandioca



Fonte: Autor.

Comparando os resultados obtidos com o ensaio qualitativo, o fungo CA4 não apresentou halo e no teste quantitativo o mesmo não apresentou atividade proteolítica. Os fungos FO4, CA9, CA7 e CA2 não foram considerados fungos produtores de protease no ensaio qualitativo por não apresentarem halo em volta do fungo, porém, no ensaio quantitativo os mesmos apresentaram atividade proteolítica, embora baixa no caso dos fungos FO4, CA2 e CA7. A presença da atividade proteolítica para os fungos FO4, CA2 e CA7 no macerado confirma que os mesmos não possuem a capacidade de secretar protease para o meio.

Assim, dos 11 fungos utilizados no ensaio, 7 foram escolhidos para se estudar a produção de proteases específicas com capacidade de hidrólise do glúten da farinha de trigo (CA2, CA3, CA6, CA9, FO2, FO3 e, FO5).

Salienta-se que foi obtida uma elevada atividade para o fungo CA6 (*Alternaria* sp), com atividade de $1,25 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína. Estudos realizados por Valueva et al (2015) avaliaram a atividade proteolítica de *Alternaria alternata*, *Alternaria solani* e *Alternaria infectoria* isolados de tomate e batata e usaram a azo-caseína para determinação da atividade proteolítica de cada espécie de fungo. Neste estudo, avaliou-se a influência do tempo de crescimento de cada fungo na atividade proteolítica. A atividade específica evidenciada após 18 dias de crescimento das colônias ficou entre 0 a 6 U/g de peso de micélio seco para *Alternaria solani*, 0,5 a 8 U/g de peso de micélio seco para *Alternaria alternata* e 2,5 U/g de peso de micélio seco para *Alternaria infectoria*.

Outro fungo que mostrou um bom resultado no teste foi a FO2 (*Xylaria* sp), com atividade de $0,62 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína. Esse fungo já foi isolado de um cacto (*Opuntia ficusindica*), onde o mesmo apresentou atividade proteolítica (BEZERRA et al., 2012).

O fungo CA9 (*Phomopsis* sp.) não mostrou formação de halo no ensaio qualitativo, porém no ensaio quantitativo exibiu atividade proteolítica de $0,55 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína. Possivelmente, isso se deve ao fato do fungo CA9 não ter a capacidade de secretar proteases para o meio. Com isso, a protease produzida pelo fungo fica armazenada em suas células. Como no ensaio quantitativo é necessário o rompimento celular para preparo dos extratos brutos, a enzima produzida pelo fungo foi secretada ao realizar esse rompimento. Estudos realizados por Rajesh e Rai (2013), mostram que ao isolar o fungo *Phomopsis* sp de uma espécie comum na Índia (*Ventilago madraspatana*) e testar sua atividade proteolítica utilizando caseína como substrato e reagente de Folin-Denis para identificar a quantidade do aminoácido

tirosina que é liberada quando a enzima reage com o substrato caseína, a atividade proteolítica apresentada é de 1130,3 U.L⁻¹. O fungo também exibiu atividade para enzimas amilase e celulase.

Já o fungo FO5 (*Peniophora* sp.) apresentou atividade proteolítica de 0,48 U.mg⁻¹ de proteína, porém, não foram encontrados estudos de atividade proteolítica desse fungo.

Os fungos FO3 (*Cladosporium xanthochromaticum*) e CA3 (*Cladosporium* sp.) pertencem ao mesmo gênero e apresentaram atividade proteolítica de 0,45 U.mg⁻¹ de proteína e 0,38 U.mg⁻¹ de proteína, respectivamente. Não foram encontrados estudos de atividade proteolítica do fungo *Cladosporium xanthochromaticum*. O fungo *Cladosporium* sp. foi estudado por Murao e colaboradores (1972) a fim de determinar o pH e temperatura ótima das proteases ácidas produzidas pelo mesmo, sendo o pH ótimo determinado entre 2,5 a 2,7 e temperatura ótima de 55 °C. Estudos realizados por Hankin e Anagnostakis (1975) usando meios específicos para determinar diversas atividades enzimáticas em fungos, mostraram resultado positivo para atividade das enzimas lipase, protease, uréase e fosfatase para esse fungo.

O fungo CA2 (*Colletotrichum* sp.) apresentou atividade proteolítica de 0,19 U.mg⁻¹ de proteína. Estudos realizados por Bezerra (2017) determinaram atividades das enzimas amilase, protease, celulase, pectinase, lacase e lipase isoladas do fungo *Colletotrichum* sp. obtidos através do guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*). Dos 15 fungos endofíticos isolados do guaranazeiro, 11 apresentaram atividade proteolítica e dos 15 fungos patogênicos isolados, 12 apresentaram atividade proteolítica. Estudos realizados com fungos isolados das plantas medicinais *Alpinia calcarata*, *Bixa orellana*, *Calophyllum inophyllum* e *Catharanthus roseus*, levaram ao isolamento de 50 fungos, sendo que o fungo *Colletotrichum* sp. mostrou atividade proteolítica (SUNITHA; NIRMALADEVI; SRINIVAS, 2013).

5.4 EXTRAÇÃO DAS FRAÇÕES PROTEICAS DA FARINHA DE TRIGO

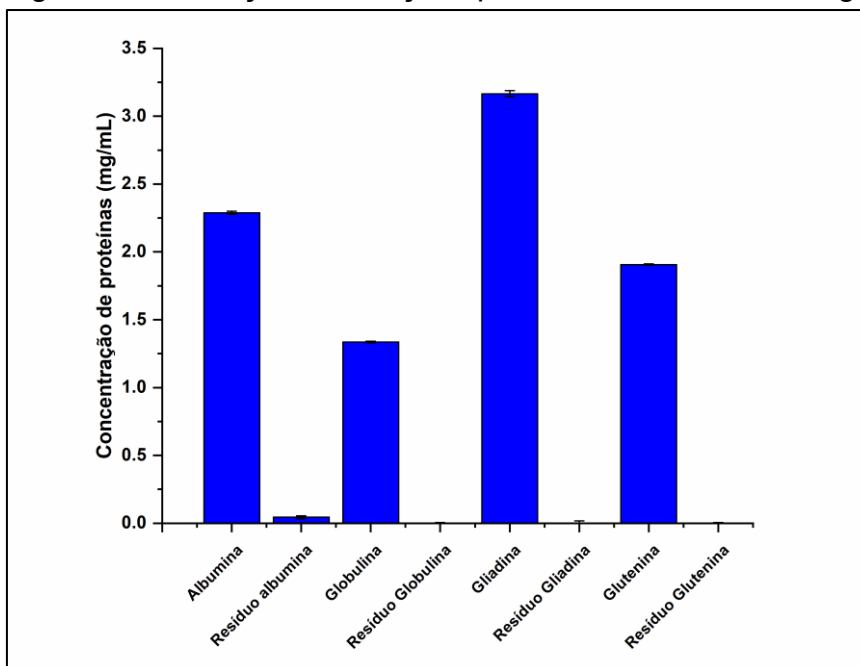
Uma vez que o objetivo do presente trabalho é a verificação da produção de proteases específicas que possibilitem a hidrólise do glúten da farinha de trigo e, levando-se em consideração que as principais proteínas presentes no mesmo são: gliadina, glutenina, globulina e albumina, foi realizada a separação dessas frações

proteicas para posterior análise da hidrólise das mesmas pelos extratos enzimáticos provenientes dos 7 fungos selecionados (CA2, CA3, CA6, CA9, FO2, FO3 e, FO5).

Neste ensaio foi utilizada água destilada para a extração das albuminas, solução de NaCl 0,5 M para globulinas, solução de etanol 80% (v/v) para gliadinas e solução de ácido acético 0,1 M para gluteninas, conforme trabalhos realizados por Shomer e colaboradores (1995) e (1998).

Através da análise dos resultados de conteúdo proteico de cada fração (Figura 34) e, levando-se em consideração os resultados relatados por Shomer e colaboradores (1995) e (1998), verifica-se que o último resíduo do solvente de extração utilizado para extrair as frações proteicas da farinha de trigo mostra que todo o componente solúvel ao solvente foi extraído, com exceção da albumina em que restou 1,92%.

Figura 34 - Extração das frações proteicas da farinha de trigo



Fonte: Autor.

Estudos realizados por Savi (2014) mostram a utilização de diversos solventes para a extração das proteínas da farinha de trigo (albumina, globulina, gliadina e glutenina). Para a extração das gluteninas, foi utilizado o 1-propanol 50% (v/v) contendo 1% de SDS (v/v) a fim de estudar a temperatura de desnaturação das mesmas por calorimetria diferencial exploratória (DSC). Para analisar a eficiência do último sobrenadante da extração da glutenina, foi realizada uma análise em gel de

eletroforese e o mesmo apresentou bandas na faixa de 86,7 KDa correspondentes as gluteninas de alta massa molecular e 48,25 KDa e 39,1 KDa para as gluteninas de baixa massa molecular.

Estudos realizados por Nascimento (2008) avaliaram a aplicação da extração líquido-líquido para separação de glutenina da farinha de trigo por meio de sistema aquoso bifásico composto por polietilenoglicol, sais inorgânicos e água. A fim de se obter a glutenina, o autor primeiramente, realizou uma lavagem com 1-propanol 50% (v/v) em uma massa de farinha de trigo para realizar a extração das gliadinas. No precipitado residual da primeira lavagem, foi adicionado solução de ácido propiônico 2%, seguida de agitação e centrifugação para se obter um sobrenadante rico em glutenina que foi utilizado para realização dos estudos.

Outro estudo realizado por Schalk et al (2017) com o objetivo de isolar as proteínas do glúten do trigo, centeio, cevada e aveia, utilizaram diferentes soluções de extração. Na primeira extração a 22 °C por 10 minutos foi utilizada água destilada para as albuminas. Já as globulinas foram extraídas com solução salina contendo 0,4 mol/L de NaCl e 0,067 mol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ pH 7,6. A terceira extração, realizada a 22 °C por 10 minutos com etanol 60% (v/v), levou à extração das gliadinas e a quarta extração, realizada com solução 2-propanol 50% (v/v) contendo 0,1 mol/L Tris-HCl pH 7,5 e 2 mol/L (m/v) uréia e 0,06 mol/L (m/v) de ditiotreitól a 30 °C por 30 minutos, possibilitou a separação das gluteninas.

5.5 HIDRÓLISE DAS FRAÇÕES PROTEICAS DA FARINHA DE TRIGO

Os extratos enzimáticos dos 7 fungos selecionados (CA2, CA3, CA6, CA9, FO2, FO3 e, FO5) foram testados na reação de hidrólise das frações proteicas da farinha de trigo. Assim, os extratos foram colocados em contato com soluções de gliadina e a glutenina, extraídas da farinha de trigo. Dos 7 fungos, somente o extrato do fungo CA6 foi capaz de hidrolisar tanto a gliadina quanto a glutenina (Figura 35 e 36 e Apêndice E).

Verifica-se a presença de aminoácidos livres liberados pela hidrólise da gliadina e da glutenina pela reação destes com a ninidrina adicionada ao tubo que, ao reagir com os aminoácidos liberados, confere uma coloração roxa a solução (TORO; GARCÍA-CARREÑO, 2002). Ainda de acordo com Toro e García-Carreño (2002), a prolina e hidroxiprolina seriam os únicos aminoácidos que, ao reagir com a ninidrina,

fariam com que a solução se tornasse amarela, porém, ao analisar a composição de aminoácidos da gliadina e glutenina, de acordo com Koehler e Wieser (2013), elas possuem maior percentual em mols de glutamina, fenilalanina, tirosina e glicina do que o percentual em mols de prolina, dando ao seu hidrolisado a característica roxa ao reagir com a solução reveladora.

Figura 35 - Reação da ninidrina com o hidrolisado de gliadina e glutenina.



Fonte: Autor.

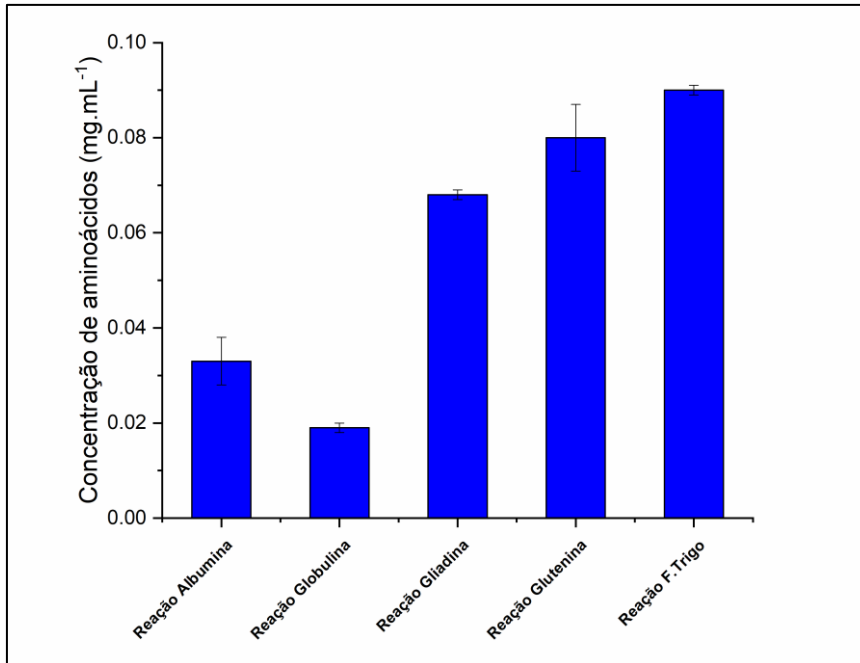
Legenda: Da esquerda para a direita: 1 (água), 2 (o extrato enzimático), 3 (gliadina), 4 (glutenina), 5 (gliadina com o extrato enzimático) e, 6 (glutenina com o extrato enzimático).

Logo após a realização desse experimento prévio, o extrato bruto enzimático do fungo CA6 foi selecionado para a realização das demais etapas: hidrólise da farinha de trigo, determinação do pH ideal de crescimento do fungo, determinação do tempo e pH ideais de reação e pré purificação das enzimas de interesse.

Pela Figura 36 é possível observar que o extrato bruto enzimático do fungo CA6 possui capacidade de hidrolisar todas as frações proteicas da farinha de trigo, sejam as frações isoladas ou diretamente aplicadas na farinha de trigo, porém não se pode afirmar qual fração hidrolisou mais ao aplicar o extrato enzimático na farinha de trigo diretamente. Ao dividir a quantidade de aminoácidos livres liberados após a hidrólise de cada substrato pela quantidade de proteínas presentes no substrato, é possível se

obter a relação de hidrólise de cada composto majoritário presentes na farinha (Tabela 18).

Figura 36 - Hidrólise das frações proteicas da farinha de trigo



Fonte: Autor.

Tabela 18 - Relação de hidrólise de cada composto presente na farinha

Substrato	Concentração Proteica Média no substrato (mg/mL)	Concentração aminoácidos médio após a reação (mg/mL)	Concentração de aminoácidos liberados por mg de substrato
Albumina	2,289	0,033	0,144
Globulina	1,336	0,019	0,142
Gliadina	3,166	0,068	0,215
Glutenina	1,907	0,08	0,420

Fonte: Autor.

Esses resultados corroboram com estudos realizados por Nightingale et al. (1999), que comprovaram que sementes de trigo contaminados com os fungos *Fusarium graminearum* e *Fusarium avenaceum* apresentaram a hidrólise enzimática das proteínas de armazenamento do trigo, no caso a gliadina e a glutenina. Neste estudo, o trigo contendo os fungos foi analisado via SDS-PAGE e HPLC, sendo obtidos resultados que comprovam que a quantidade de proteínas do trigo diminuiu com a presença do fungo e, em estudo de reologia da massa, a mesma ficou mais fraca.

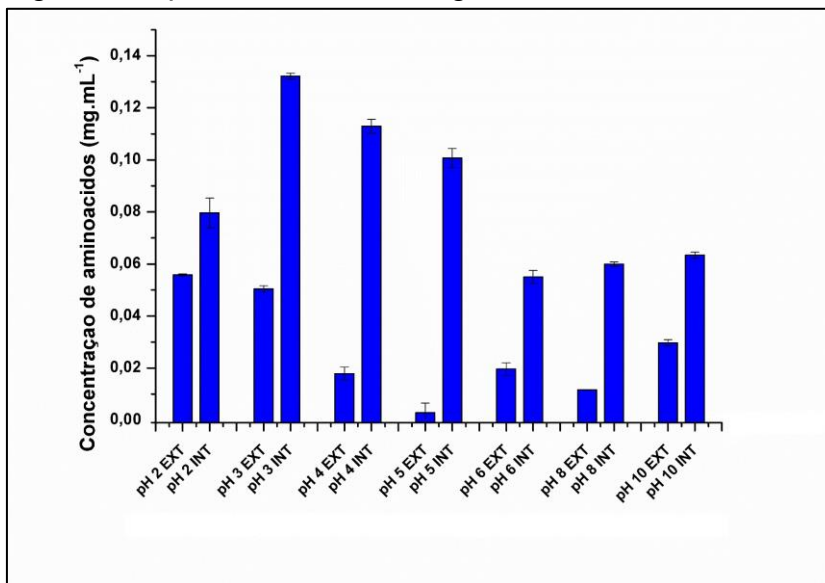
Estudos realizados por M'hir et al. (2009) demonstraram que quando bactérias *enterococcus* e o fungo *Rhizopus oryzae* são inoculadas em uma solução aquosa de 20% (m/m) de farinha de trigo e colocadas em fermentação por 48 horas, a 37 °C e a 200 rpm, as mesmas demonstram proteases com capacidade de hidrolisar as frações do glúten. Para validar a hidrólise da farinha de trigo pelas proteases do fungo, os aminoácidos liberados foram analisados com ninidrina.

5.6 pH OTIMO DE PRODUÇÃO DA PROTEASE DO FUNGO SELECIONADO

A fim de determinar o melhor pH de crescimento dos fungos em meio líquido para a produção da protease de interesse, micélios do fungo CA6 foram colocados em meios contendo 0,2% (m/v) de KH_2PO_4 , 0,8% (m/v) de NaH_2PO_4 , 0,25% (m/v) de MgSO_4 , 2% (m/v) de peptona, 1% (m/v) de extrato de levedura e 2% (m/v) de glicose, sendo posteriormente solubilizados em 7 tampões diferentes, nos pH's 2, 3, 4, 5, 6, 8 e 10.

Analisando-se os resultados (Figura 37, apêndice F), verifica-se que o fungo CA6 produz a protease de interesse de forma interna e externa em praticamente todos os pH's, porém, naqueles mais baixos (2, 3, 4 e 5), a hidrólise das proteínas da farinha de trigo foi mais significativa, especialmente no pH 3 interno e pH 2 externo, onde se obteve o melhor resultado de todos.

Figura 37 - pH de cultivo do fungo CA6



Fonte: Autor.

De acordo com Zanphorlin e colaboradores (2011), para garantir o crescimento celular, muitos microrganismos secretam proteases para o ambiente externo a fim de obter outras fontes de carbono a partir da hidrólise de proteínas. O fungo CA6 possui a capacidade de secretar proteases para o ambiente externo, e isso pode ser causado devido ao esgotamento da fonte de carbono, no caso, a glicose.

De acordo com estudos realizados por Zaferanloo e colaboradores (2014), o fungo da espécie *Alternaria alternata* isolado de uma planta nativa da Austrália (*Eremophila longifolia*) obteve atividade proteolítica ao ser cultivado em pH's 3, 5, 7 e 9. Este estudo corrobora com o resultado obtido para o fungo CA6 (*Alternaria* sp.), em que foi obtida atividade proteolítica ao ser cultivado em pH's 2, 3, 4, 5, 6, 8 e 10.

Outro estudo que corrobora com o resultado obtido é o de Rajput, Chanyal, e Agrawal (2016), que obtiveram a espécie *Alternaria alternata* isolada do Cipreste do Himalaia (*Cupressus torulosa*) e analisaram a atividade proteolítica extracelular desse fungo ao realizar o crescimento dele em diversos meios com pH's diferentes. No estudo, o fungo obteve atividade proteolítica extracelular nos pH's 3, 5, 7, 9, 11 e 12. Analisando os resultados obtidos do fungo CA6, este também obteve atividade proteolítica extracelular em todos os pH's de cultivo.

Conforme observado nas referências citadas anteriormente, os fungos analisados possuem atividade proteolítica em vários pH's, porém, o pH ótimo de cultivo dos dois estudos se situa na faixa neutra, em torno de 7. Não foram encontradas referências que mostram o pH ótimo de cultivo do fungo em pH 3, porém, isso pode estar ligado ao fato do fungo CA6 ter capacidade de produção de proteases ácidas. De acordo com Rao e colaboradores (1998), no caso das proteases aspárticas, verifica-se uma faixa de pH ótimo na região de 3 a 4,5.

5.7 TEMPO DE HIDRÓLISE DA FARINHA DE TRIGO

Determinado o pH ideal de crescimento do fungo para a produção da enzima de interesse, foi realizado um estudo do tempo de hidrólise ideal da farinha de trigo com o extrato enzimático do fungo CA6 crescido em meio líquido em pH 3 (Figura 38, apêndice G). O estudo foi realizado até que a quantidade de aminoácidos livres no hidrolisado permanecesse constante.

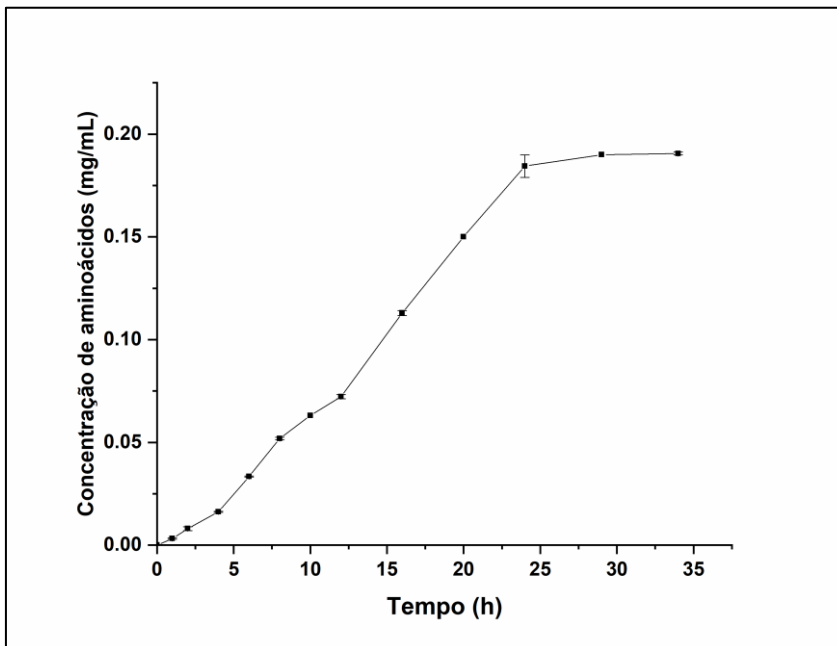
Figura 38 - Hidrolisado proteico da farinha de trigo em função do tempo



Fonte: Autor.

Ao analisar-se os resultados obtidos (Figura 39), verifica-se que a hidrólise das frações proteicas da farinha de trigo ocorre até 25 horas, sendo que, logo após esse período, o valor da concentração de aminoácidos livres se torna constante.

Figura 39 - Tempo de hidrólise proteica da farinha de trigo



Fonte: Autor.

Através do estudo realizado com proteases obtidas do fungo *Fusarium graminearum*, Eggert et al. (2011) verificou resultados promissores durante a hidrólise das frações proteicas da farinha de trigo, mais especificamente a gliadina e a glutenina. A reação foi conduzida adicionando-se gliadina e glutenina junto com extrato enzimático obtido do fungo *Fusarium graminearum* e a reação foi conduzida a 37 °C por 24 horas. Nesse estudo, foi realizada uma análise via HPLC dos produtos de reação obtidos em diferentes tempos e verificou-se que em 24 horas de reação houve completa ausência de gliadinas e perda das frações de gluteninas.

Proteases comerciais já foram estudadas por Kong et al. (2007) a fim de determinar o grau de hidrólise do glúten do trigo. Foram analisadas 8 proteases comerciais com diferentes pH's de reação, desde proteases ácidas, neutras até básicas. Para medir o grau de hidrólise, retirou-se alíquotas de hora em hora e utilizou-se o método de solubilidade do nitrogênio em solução de 10% de ácido tricloroacético. Com isso, determinou-se que a protease alcalase levou aos melhores resultados de hidrólise e o mesmo permaneceu constante no tempo de 24 horas de reação.

Comparando as duas referências anteriores, os tempos de hidrólise das proteínas da farinha de trigo foram de 24 horas e esse valor fica próximo do resultado obtido no experimento, no caso, de 25 horas.

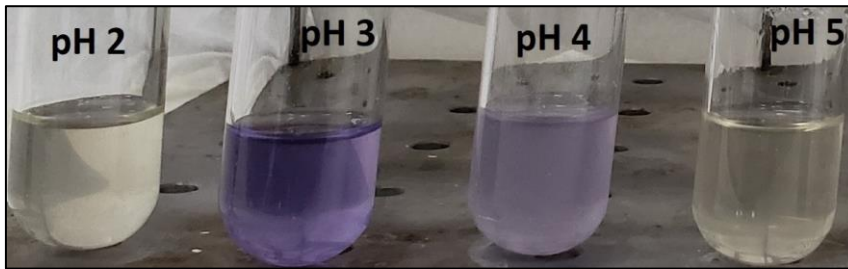
5.8 pH DE HIDRÓLISE DA FARINHA DE TRIGO

Além do estudo do tempo ideal de reação, também foi realizado o estudo do pH ótimo de hidrólise da farinha de trigo com o extrato enzimático do fungo CA6 nos pHs 2, 3, 4, e 5.

Através da análise qualitativa dos hidrolisados, verificou-se que o pH ideal de hidrólise da farinha de trigo pela protease do fungo CA6 foi entre 3 e 4, sendo mais intensa no pH 3. Verificou-se também que, em pH's superiores a 4, começa a ocorrer a redução da atividade proteolítica, o que é evidenciado pela diminuição da hidrólise da farinha de trigo conforme mostram as Figuras 40 e 41 (apêndice H).

Através da análise quantitativa dos aminoácidos livres em solução (Figura 41), é possível observar que o pH ideal de reação foi 3, ocorrendo uma redução da atividade enzimática significativa em pH's mais elevados e mais baixos.

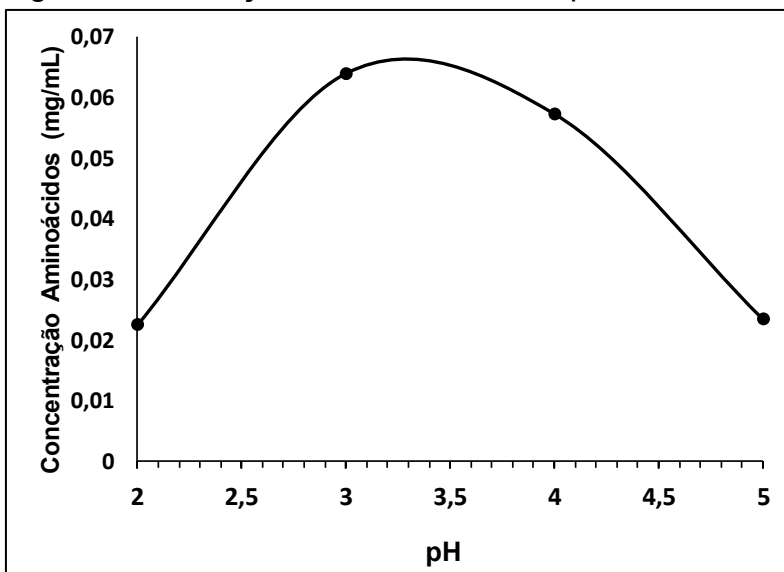
Figura 40 - Estudo do pH de hidrólise da farinha de trigo.



Fonte: Autor.

Legenda: Tubos da esquerda para a direita: pH 2, pH 3, pH 4, pH 5

Figura 41 - Variação da hidrólise com o pH



Fonte: Autor.

Estudos realizados por Deng e colaboradores (2016) avaliaram as condições ótimas de hidrólise do glúten do trigo por proteases ácidas produzidas por *Aspergillus usarii*. Neste estudo verificou-se que as condições ótimas de reação foram: temperatura de 48,9 °C, pH 3, relação enzima/substrato 1,6 e tempo de hidrólise de 2,5 horas.

Matsuwaki e colaboradores (2009), na tentativa de correlacionar a resposta imunológica produzida durante a crise de asma à exposição a certos fungos, descobriram que o fungo da espécie *Alternaria alternata* produz proteases da classe das aspárticas, através da inibição das mesmas por inibidor *Pepstatin A*.

Bleux e colaboradores (1998) isolaram uma protease aspártica presente no glúten do trigo e verificaram que esta possui capacidade de hidrolisar o próprio glúten, demonstrando máxima capacidade de hidrólise em pH 3.

Dessa forma, os estudos referenciados corroboram com o resultado obtido no presente estudo, uma vez que a protease produzida pelo fungo CA6 demonstra atividade proteolítica máxima em pH 3.

5.9 PRÉ PURIFICAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO CA6

Determinados o pH ideal de crescimento do fungo bem como o tempo e o pH ideais de reação, realizou-se uma pré purificação do extrato enzimático através da precipitação salina com sulfato de amônio adicionado em quantidades suficientes para atingir uma saturação de 25, 50 e 75 %. Na tabela 19, é apresentada a concentração de aminoácidos liberados na reação com a solução de farinha de trigo ao utilizar 0,25 mL dos precipitados (Apêndice I), a dosagem proteica média por mL de cada precipitado (Apêndice J), o volume total de precipitado, a concentração de aminoácidos total no meio reacional, e a concentração de proteínas total dos precipitados.

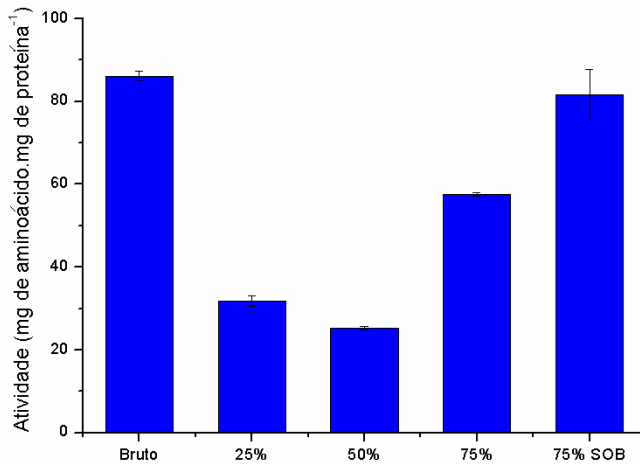
Tabela 19 - Hidrólise da farinha de trigo pelos precipitados

Precipitado	C. Aminoácidos Média por mL de precipitado ((mg/mL)/0,25 mL precipitado)	C. Proteínas Média por mL precipitado (mg/mL precipitado)	Volume de precipitado utilizado na reação (mL)	Total de aminoácidos para 10 mL de meio reacional (mg)	Total de proteínas no precipitado (mg proteínas)
Bruto	0,203	0,094	100 mL	810,029	9,4
25%	0,051	0,064	2 mL	4,069	0,128
50%	0,070	0,111	2 mL	5,615	0,222
75%	0,320	0,222	2 mL	25,583	0,444
75% SOB	0,169	0,083	100 mL	677,712	8,3

Fonte: Autor.

Com a concentração de aminoácidos média total e com a concentração proteica de cada precipitado total, é possível calcular a atividade específica de cada precipitado (Figura 42, apêndice K)

Figura 42 - Atividade específica de cada precipitado



Fonte: Autor

Através da análise dos dados, verifica-se que as enzimas específicas para hidrólise das proteínas do trigo se encontram nos precipitados de 75% (57,503 mg aminoácidos/mg proteínas) e sobrenadante obtido após a saturação com 75% de sulfato de amônio (75% SOB) (81,693 mg aminoácidos/mg proteínas), este último apresentado maior atividade específica e muito próxima do extrato bruto (86,115 mg aminoácidos/mg proteínas).

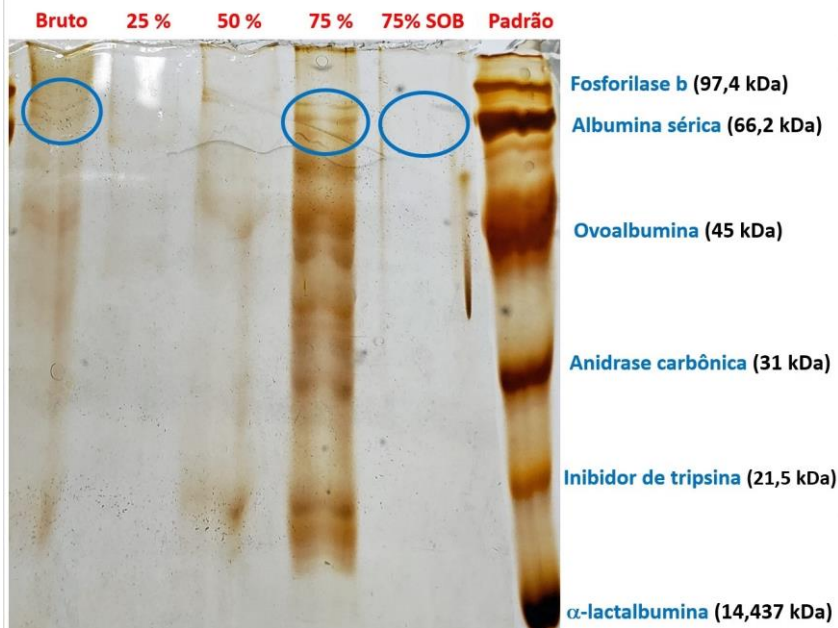
Os resultados obtidos corroboram com os dados observados por Nitsawabg e colaboradores (2006), que estudaram dois métodos de purificação da protease papaina, obtida do latex da *Carica papaya*. Foram comparados os métodos de precipitação salina com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 45% de saturação e um sistema bifásico contendo 8% de polietilenoglicol e 15% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em água. Tanto a purificação com precipitação salina quanto a purificação em sistema bifásico apresentaram bandas da protease papaina no gel, validando os dois métodos de purificação e confirmando a eficiência da técnica adotada na purificação de proteases.

Através de trabalhos realizados por Devi e colaboradores (2008), que caracterizaram e purificaram uma protease alcalina obtida do fungo *Aspergillus niger*, observou-se um aumento da atividade proteolítica do extrato bruto, que foi de 20 U/mL para 69,3 U/mL após a precipitação salina, reforçando a hipótese de aplicabilidade da técnica para purificação de proteases.

Assim, após a verificação da eficiência da precipitação na pré purificação das proteases de interesse, visando uma melhor descrição das frações proteicas obtidas

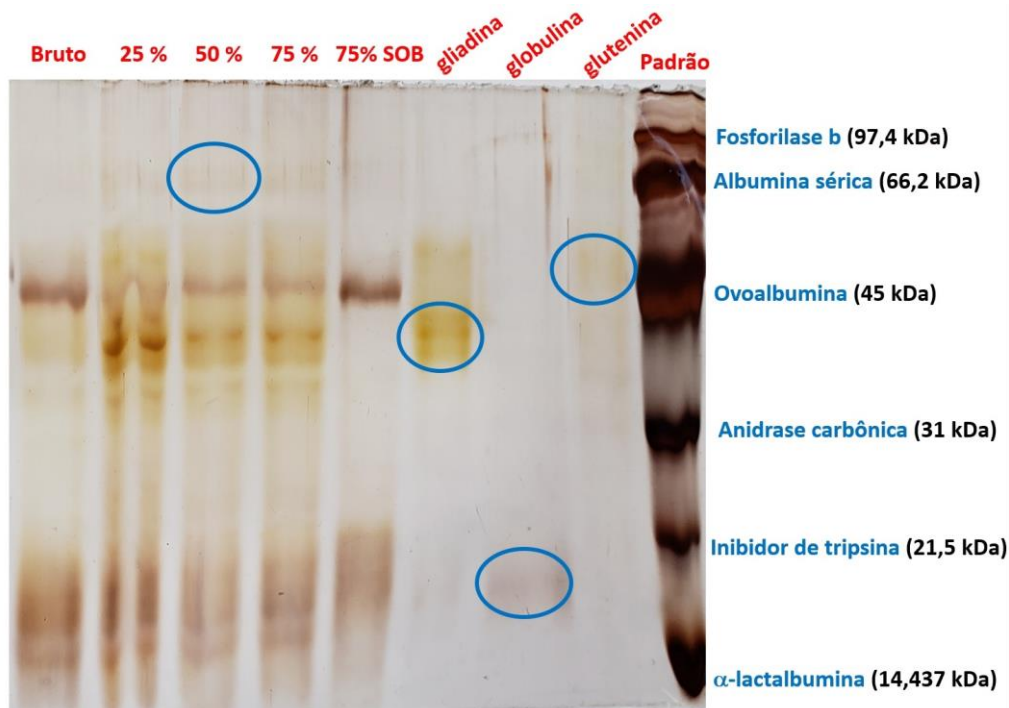
após a precipitação salina, foi realizada uma análise por SDS - PAGE dos precipitados (Figura 43) e de alguns hidrolisados proteicos da farinha de trigo (Figura 44), a fim identificar as massas moleculares das proteases de interesse.

Figura 43 - Gel de eletroforese dos precipitados



Fonte: Autor.

Figura 44 - Gel de eletroforese dos hidrolisados proteicos



Fonte: Autor.

Através da relação logarítmica entre a distância percorrida pelas proteínas do padrão e suas massas moleculares, foi possível determinar a possível massa molecular média das proteases envolvidas na hidrólise do glúten. Dessa forma, verificou-se a presença de duas possíveis proteases envolvidas na reação desejada, uma com massa molecular média de aproximadamente 72 kDa e outra com 76 kDa.

Ao realizar a análise do gel de eletroforese referente a reação dos precipitados (bruto, 25%, 50%, 75%, e sobrenadante proveniente da saturação com 75% de sulfato de amônio) com a farinha de trigo, pode-se concluir que o bruto e sobrenadante de 75% conseguiram reduzir as bandas que se encontram pouco abaixo de 45 kDa, ao comparar com o padrão gliadina. Já os precipitados de 50% e 75% conseguiram reduzir a banda de 45 kDa em 21 horas de reação.

Comparando os trabalhos de Koehler e Wieser (2013) com o de Schalk e colaboradores (2017), a gliadina é dividida em 4 grupos, em que o peso molecular pode variar de 28 a 55 kDa. Ao relacionar esses pesos com o resultado obtido em gel, pode-se concluir que os precipitados conseguiram hidrolisar as faixas presentes na gliadina, sendo algumas faixas completamente eliminadas, no caso do precipitado de 100% e outras faixas menos visíveis, como no caso do bruto, 50% e 75%.

Esses resultados corroboram com os dados obtidos por Masson, Tomé e Popineau (1986), que estudaram a cinética de hidrólise da gliadina e glutenina, utilizando a enzima pepsina. Durante essa análise, nos primeiros minutos de reação entre a gliadina e a enzima, verificou-se a formação de bandas entre 30 KDa a 20 KDa e entre a glutenina e a pepsina foram formadas bandas entre 68 KDa a 65 KDa, 34 KDa a 23 KDa e, por último, entre 15 KDa a 9 KDa. Entre 40 minutos e 120 minutos de reação entre a gliadina e a pepsina, notou-se o desaparecimento das bandas acima de 20 KDa e a formação de bandas entre 14 KDa a 10 KDa e, entre a glutenina e a pepsina, bandas foram formadas na região de 24 KDa e as demais bandas acima deste peso desapareceram. Ao atingir 24 horas de reação entre a gliadina e a pepsina, notou-se o desaparecimento das demais bandas, e somente a formação de uma única banda abaixo de 10 KDa e entre a glutenina e a pepsina, após 24 horas de reação, as bandas de massa molecular acima dos 15 KDa desapareceram.

Assim, confirma-se a eficiência na hidrólise do glúten pelo extrato enzimático pré fracionado e verifica-se uma nova possibilidade de obtenção de proteases ativas na hidrólise do glúten para realização de trabalhos futuros.

5.10 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA FRENTE A INIBIDORES

A avaliação da atividade enzimática foi verificada frente aos inibidores E64 (inibidor de cisteíno proteases), pepstatina A (inibidor de aspartil proteases); PMSF (inibidor de serino proteases) e ortofenantrolina (inibidor de metaloproteases). Analisando os resultados qualitativos (Figura 45) e quantitativos (Tabela 20), entende-se que a protease envolvida na digestão do glúten é uma aspartilprotease.

Figura 45 - Atividade enzimática frente a diferentes inibidores de proteases



Fonte: Autor.

Tabela 20 - Concentração de aminoácidos para cada inibição

Inibidor	Concentração Aminoácidos (mg/mL)
Branco	0,203
E-64	0,210
Pepstatina	0,041
PMSF	0,181
Ortofenantrolina	0,178

Fonte: Autor.

A enzima do extrato bruto CA6 é inibida pela pepstatina, indicativo de que as enzimas relacionadas à hidrólise das proteínas do trigo são da classe da aspartil protease.

O resultado deste estudo está de acordo com referências citadas anteriormente, como no caso de Matsuwaki e colaboradores (2009), que verificaram através de testes de inibição com pepstatina que o fungo *Alternaria alternata* produz proteases da classe aspártica, fungo este pertencente ao mesmo gênero do fungo CA6.

O resultado obtido também está de acordo com o melhor pH de cultivo para obtenção da protease e o pH ótimo de hidrólise, onde este se situa na faixa de 3, de acordo com Mamo e Assefa (2018), faixa considerada ótima para as proteases da classe aspártica.

Outros trabalhos também relacionam aspartil proteases com a hidrólise do glúten, como no caso de Belozersky, Sarbakanova e Dunaevsky (1989), que isolaram esta classe de enzimas de sementes de trigo e descobriram que a mesma foi completamente inibida por pepstatina.

6 CONCLUSÕES

Foram isolados e identificados 14 fungos a partir de folhas e caules de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), sendo que 9 fungos foram obtidos do caule e 5 fungos foram obtidos da folha.

Os fungos isolados foram identificados a partir de sequenciamento de DNA e foram obtidas 11 culturas de fungos diferentes. Esses fungos identificados já foram estudados e isolados de diversas espécies de plantas e frutos.

Dos 11 fungos isolados, 10 apresentaram atividade proteolítica frente ao substrato azocaseína, porém, frente ao substrato de interesse, o glúten, somente 1 fungo (CA6) conseguiu hidrolisar a gliadina e a glutenina extraídas da farinha de trigo.

Para estudo das condições ótimas de hidrólise do substrato, o fungo CA6 foi cultivado em diferentes valores de pH e demonstrou melhores resultados de hidrólise das proteínas da farinha de trigo ao ser cultivado em pH 3.

Estudos do pH ideal e tempo de reação foram realizados e a protease do fungo CA6 obteve máxima atividade proteolítica em pH 3 e um tempo de reação de 25 horas.

A pré-purificação do extrato enzimático do fungo CA6, através do método da precipitação salina utilizando $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, mostrou que a atividade específica foi maior nos precipitados de 75% (57,503 mg aminoácidos/mg proteínas) e sobrenadante obtido após a saturação com 75% (81,693 mg aminoácidos/mg proteínas).

O gel de eletroforese dos precipitados do extrato enzimático apresentou duas possíveis bandas para a protease de interesse, sendo uma com 72 kDa e outra com 76 kDa.

O teste de inibição da enzima de interesse, identificou que a presente protease é inibida por pepstatina, confirmando que sua classe se refere às aspartil proteases.

Como perspectivas futuras, é possível citar a purificação da protease específica relacionada com a hidrólise do glúten, estudos para imobilização da enzima do fungo CA6, e caracterizações bioquímicas com o objetivo de criar medicamentos e outras terapias envolvidas no combate à intolerância ao glúten.

REFERÊNCIAS

- ADEKUNLE, A.; ORSAT, V.; RAGHAVAN, V. Lignocellulosic bioethanol: A review and design conceptualization study of production from cassava peels. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 64, p. 518-530, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.06.064>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032116302994>. Acesso em: 20 Setembro 2018.
- AGUILLAR, J. G. D. S.; SATO, H. H. Microbial proteases: Production and application in obtaining protein hydrolysates. **Food Research International**, v. 103, p. 253-262, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.10.044>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996917307287>. Acesso em: 08 Janeiro 2019.
- ALLEM, A. C. The origin of *Manihot esculenta* Crantz (Euphorbiaceae). **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 41, p. 133-140, 1994. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00051630>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00051630>. Acesso em: 14 Abril 2018.
- ALTERTHUMM, F. Elementos de Microbiologia. In: BORZANI, W., *et al.* **Biotecnologia Industrial**. 1. ed. São Paulo: Blucher, v. 1, 2001. Cap. 1, p. 1-32.
- AMIRITA, A. *et al.* Enumeration of endophytic fungi from medicinal plants and screening of extracellular enzymes. **World Journal of Science and Technology**, p. 13-19, 2012. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/284088252_Enumeration_of_endophytic_fungi_from_medicinal_plants_and_screening_of_extracellular_enzymes. Acesso em: 25 Março 2018.
- ANDRADE, H. F. D. *et al.* Screening of endophytic fungi stored in a culture collection for taxol production. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, p. 59-63, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2018.06.001> Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1517838218302478>. Acesso em: 5 Janeiro 2019.
- AUTRAN, J.-C.; HALFOR, N. G.; SHEWRY, P. R. The Biochemistry and Molecular Biology of Seed Storage Proteins. **Journal Plant Nitrogen**, p. 295-341, 2001. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-662-04064-5_12. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-662-04064-5_12. Acesso em: 5 Janeiro 2019.

BAMISILE, B. S. *et al.* Prospects of endophytic fungal entomopathogens as biocontrol and plant growth promoting agents: An insight on how artificial inoculation methods affect endophytic colonization of host plants. **Microbiological Research**, v. 217, p. 34-50, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.08.016>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501318303288>>. Acesso em: 02 Dezembro 2018.

BEAKOU, B. H. *et al.* Novel activated carbon from *Manihot esculenta* Crantz for removal of Methylene Blue. **Sustainable Environment Research**, v. 27, p. 215-222, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.serj.2017.06.003>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2468203917300535>>. Acesso em: 25 Agosto 2018.

BELOZERSKY, M. A.; SARBAKANOVA, S. T.; DUNAEVSKY, Y. E. Aspartic proteinase from wheat seeds: isolation, properties and action on gliadin. *Planta*, v. 177, p. 321-326, 1989. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00403589>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24212424>>. Acesso em: 20 Maio 2019.

BELITZ, H.-D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. Cereals and Cereal Products. In: BELITZ, H.-D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. **Food Chemistry**. 4. ed. [S.l.]: Springer, 2009. Cap. 15, p. 670-745. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-540-69934-7_16. Disponível em: <https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-540-69934-7_16>. Acesso em: 20 Agosto 2018.

BENDER, D.A. Nutritional Biochemistry of the Vitamins. 2ª ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1017/CBO9780511615191>. Disponível em: <<https://www.cambridge.org/core/books/nutritional-biochemistry-of-the-vitamins/10B31039A2B0F4B4DC58A89C523FAE97>>. Acesso em: 20 Junho 2019.

BERSANETTI, P. A. *et al.* Characterization of arazyme, an exocellular metalloprotease isolated from *Serratia proteamaculans* culture medium. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, n. 6, p. 574-581, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.01.041>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022905001663>>. Acesso em: 13 Maio 2019.

BEZERRA, C. D. S. **Caracterização enzimática de *Colletotrichum* spp. isolados de *Paullinia cupana* Kunth. var. *sorbilis* (Mart.)**. 2017. 106 p. Dissertação (Mestrado em Agricultura no Trópico Úmido) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 2017. Disponível em: <http://w2.files.scire.net.br/atrio/inpa-atu_upl/THESIS/113/dissertao_caroline_de_souza_bezerra_20170810111126667.pdf>. Acesso em: 08 Dezembro 2018.

BEZERRA, J. D. P. *et al.* Richness of endophytic fungi isolated from *Opuntia ficus-indica* Mill. (Cactaceae) and preliminary screening for enzyme production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 1989-1995, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11274-011-1001-2>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22806020>. Acesso em: 08 Dezembro 2018.

BIESIEKIERSKI, J. R. What is gluten? **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 32, p. 78-81, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1111/jgh.13703>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/jgh.13703>. Acesso em: 01 Fevereiro 2018.

BLEUKX, W. *et al.* Specificity of a wheat gluten aspartic proteinase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1387, p. 317-324, 1998. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(98\)00146-0](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(98)00146-0). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167483898001460>. Acesso em: 14 Janeiro 2019.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. **Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels**. *Electrophoresis*, v. 8, p. 93-99, 1987. DOI: <https://doi.org/10.1002/elps.1150080203>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/elps.1150080203>. Acesso em: 20 Novembro 2018.

BON, E. *et al.* **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado**. 1. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2008.

BONATO, A. L. V. *et al.* Otimização do método de extração de DNA de *Magnaporthe oryzae* de trigo. **Comunicado Técnico Online 343**, nº. 1, p. 1-25, 2014. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/114990/1/2014-Comunicado-tecnico-online-343.pdf>. Acesso em: 12 Janeiro 2018.

BORBA, A. L. C. *et al.* Fungos Fitopatogênicos na Pós-Colheita de Mandioca sob Processamento Mínimo. **Revista Técnico Científica (IFSC)**, v. 3, 2012. Disponível em: <https://periodicos.ifsc.edu.br/index.php/rtc/article/view/531>. Acesso em: 2 Maio 2019.

BOSE, U.; HOWITT, C. A.; COLGRAVE, M. L. Proteases as Digestive Aids. **Encyclopedia of Food Chemistry**, p. 314-321, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.22466-9>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780081005965224669?via%3DiHub>. Acesso em: 08 Janeiro 2019.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **ANALYTICAL BIOCHEMISTRY**, v. 72, p. 248-254, 1976. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3). Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003269776905273>>. Acesso em: 02 Fevereiro 2018.

CAGNATO, C.; PONCE, J. M. Ancient Maya manioc (*Manihot esculenta* Crantz) consumption: Starch grain evidence from late to terminal classic (8th–9th century CE) occupation at La Corona, northwestern Petén, Guatemala. **Journal of Archaeological Science: Reports**, v. 16, p. 276-286, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jasrep.2017.09.035>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352409X17303280>>. Acesso em: 2 Setembro 2018.

CAMPANHOLA, C. Cassava: A guide to sustainable production intensification. **Save and Grow**, 2013. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i3278e.pdf>>. Acesso em: 24 Setembro 2018.

CAMPBELL, M. K.; FARREL, S. O. **Bioquímica**. [S.l.]: [s.n.], 2007.

CARDOSO, R. V. C. *et al.* Physicochemical characterization and microbiology of wheat and rye flours. **Food Chemistry**, v. 280, p. 123-129, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.12.063>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814618321678>>. Acesso em: 07 Janeiro 2019.

CELIAC Disease Foundation. Disponível em: <<https://celiac.org/about-celiac-disease/related-conditions/dermatitis-herpetiformis/>>. Acesso em: 26 Janeiro 2019.

CHARNEY, J.; TOMARELLI, R. M. A Colorimetric Method For The Determination of the Proteolytic Activity of Duodenal Juice. **The Journal of Biological Chemistry**, p. 501-505, 1947. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/171/2/501.citation>>. Acesso em: 20 Março 2018.

COMPTON, S. J.; JONES, C. G. Mechanism of Dye Response and Interference in the Bradford Protein Assay. **Analytical Biochemistry**, v. 151, p. 369-374, 1985. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90190-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90190-3). Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003269785901903>>. Acesso em: 20 Janeiro 2018.

DENG, L. *et al.* Improvement of Functional Properties of Wheat Gluten Using Acid Protease from *Aspergillus usarii*. **PLoS ONE**, v. 11, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160101>. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0160101>>. Acesso em: 19 Dezembro 2018.

DEVI, M. K. *et al.* Purification, characterization of alkaline protease enzyme from native isolate *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 1, n. 7, 2008. Disponível em: <<http://www.indjst.org/index.php/indjst/article/view/29599>>. Acesso em: 10 Janeiro 2019.

DEVLIN, T.M. **Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations**. 2^a ed. New York: Wiley-Liss, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1021/jm970318a>.

DEZAM, A. P. G. *et al.* Microbial production of organic acids by endophytic fungi. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 11, p. 282-287, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.08.001>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878818117303717>>. Acesso em: 27 Abril 2018.

DIXON, M.; WEBB, E. C. **Enzymes**. 2. ed. London: Longmans, 1964.

EGGERT, K.; RAWEL, H. M.; PAWELZIK, E. In vitro degradation of wheat gluten fractions by *Fusarium graminearum* proteases. **European Food Research and Technology**, v. 233, p. 697–705, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00217-011-1566-x>. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00217-011-1566-x>>. Acesso em: 12 Março 2018.

ENGLAND, S.; SEIFTER, S. **Methods in Enzimology**: guide to protein purification. [S.l.]: San Diego: Academic Press, v. 182, 1990. 285 p.

FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, 2016. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. Acesso em: 18 Março 2019.

FERNANDES, E. G. *et al.* Diversity of endophytic fungi in *Glycine max*. **Microbiological Research**, v. 181, p. 84-92, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.05.010>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S094450131500107X>>. Acesso em: 20 Julho 2018.

FERSHT, A. **Structure and mechanism in protein Science: A guide to enzymes catalysis and protein folding**. 1. ed. New York: W.H. Freeman and Company, 2000.

FIGUEIREDO, M. M.; ALBUQUERQUE, F. C. DE. Podridão Mole das Raízes da Mandioca (*Manihot esculenta*). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 53, p. 389-393, 1970. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/193055/1/Podridao-mole-das-raizes-da-mandioca.pdf>>. Acesso em: 02 Maio 2019.

FISHAL, E. M. M.; MEON, S.; YUN, W. M. Induction of Tolerance to Fusarium Wilt and Defense-Related Mechanisms in the Plantlets of Susceptible Berangan Banana Pre-Inoculated with *Pseudomonas* sp. (UPMP3) and *Burkholderia* sp. (UPMB3). **Agricultural Sciences in China**, v. 9, n. 8, p. 1140-1149, 2010. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1671-2927\(09\)60201-7](https://doi.org/10.1016/S1671-2927(09)60201-7). Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1671292709602017>>. Acesso em: 5 Julho 2018.

FRAUENLOB, J. *et al.* Effect of physicochemical and empirical rheological wheat flour properties on quality parameters of bread made from pre-fermented frozen dough. **Journal of Cereal Science**, v. 77, p. 58-65, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2017.06.021>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0733521017301042>>. Acesso em: 15 Dezembro 2018.

FULOP, V.; BOCSKEI, Z.; POLGAR, L. Prolyl Oligopeptidase: An Unusual b-Propeller Domain Regulates Proteolysis. **Cell Press**, v. 94, p. 161-170, 1998. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81416-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81416-6). Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867400814166>>. Acesso em: 20 Maio 2019.

GAO, L.; NH, P. K. W.; BUSHUK, W. Structure of Glutenin Based on Farinograph and Electrophoretic Results. **Cereal Chemistry**, v. 69, p. 452-455, 1992. Disponível em: <https://www.aaccnet.org/publications/cc/backissues/1992/Documents/69_452.pdf>. Acesso em: 23 Março 2018.

GOBBETTI, M. *et al.* How to improve the gluten-free diet: The state of the art from a food science perspective. **Food Research International**, v. 110, p. 22-32, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.04.010>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996917301606>>. Acesso em: 15 Dezembro 2018.

GOESAERT, H. *et al.* Wheat flour constituents: how they impact bread quality, and how to impact their functionality. **Food Science & Technology**, v. 16, p. 12-30, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2004.02.011>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224404001906>>. Acesso em: 02 Abril 2018.

GONG, L. *et al.* In vitro fermentabilities of whole wheat as compared with refined wheat in different cultivars. **Journal of Functional Foods**, v. 52, p. 505-515, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.11.027>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464618306042>>. Acesso em: 7 Janeiro 2019.

GREENFIELD, M. *et al.* *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* endophytically colonize cassava roots following soil drench inoculation. **Biological Control**, v. 95, p. 40-48, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.01.002>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1049964416300020>>. Acesso em: 15 Agosto 2018.

GROSH, W.; WIESER, H. Redox Reactions in Wheat Dough as Affected by Ascorbic Acid. **Journal of Cereal Science**, v. 29, p. 1-16, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1006/jcrs.1998.0218>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0733521098902181>>. Acesso em: 01 Março 2018.

GWIRTZ, J. A.; WILLYARD, M. R.; MCFALL, K. L. Wheat: More than just a Plant. In: POPPER, L.; FREUND, W.; SCHAFER, W. **Future of flour: a compendium of flour improvement**. [S.l.]: [s.n.], 2006. Cap. 2, p. 1-10. Disponível em: <https://muehlenchemie.de/downloads-future-of-flour/FoF_Kap_02.pdf>. Acesso em: 12 Fevereiro 2018.

HAGER, A.-S. *et al.* Gluten free beer - A review. **Food Science & Technology**, v. 36, p. 44-54, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.01.001>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S092422441400003X>>. Acesso em: 20 Dezembro 2018.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The Use of Solid Media for Detection of Enzyme Production by Fungi. **Mycologia**, v. 67, p. 597-607, 1975. DOI: 10.2307/3758395. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/3758395>>. Acesso em: 08 Dezembro 2018.

HENGGELER, J. C.; VERÍSSIMO, M.; RAMOS, F. Non-coeliac gluten sensitivity: A review of the literature. **Trends in Food Science & Technology**, v. 66, p. 84-92, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.05.018>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224416303685>>. Acesso em: 10 Junho 2018.

KERPES, R.; FISCHER, S.; BECKER, T. The production of gluten-free beer: Degradation of hordeins during malting and brewing and the application of modern process technology focusing on endogenous malt peptidases. **Trends in Food Science & Technology**, v. 67, p. 129-138, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.07.004>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224417300808>>. Acesso em: 15 Julho 2018.

KHUMAIDA, N. *et al.* Cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) Improvement through Gamma Irradiation. **Procedia Food Science**, v. 3, p. 27-34, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.profoo.2015.01.003>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211601X15000048>>. Acesso em: 5 Maio 2018.

KILIKIAN, B. V. Filtração e Centrifugação. In: JR., A. P.; KILIKIAN, B. V. **Purificação de Produtos Biotecnológicos**. Barueri: Manole, 2005. Cap. 25.

KIMATI, H. *et al.* **Manual de Fitopatologia**. [S.l.]: [s.n.], 1997. Disponível em: <<http://files.prof-vanderufersa.webnode.com.br/200000142-da429dac03/Livro%20-%20Manual%20de%20Fitopatologia%20-%20vol.2.pdf>>. Acesso em: 20 Novembro 2018.

KOAZE, Y. *et al.* Fungal Proteolytic Enzymes Part I. Isolation of two Kinds of Acid-proteases Excreted by *Aspergillus niger* var. *macrosporus*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 28, n. 4, p. 216-223, 1964. DOI: <https://doi.org/10.1080/00021369.1964.10858233>. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00021369.1964.10858233>>. Acesso em: 19 Dezembro 2018.

KOEHLER, P.; WIESER, H. Chemistry of Cereal Grains. In: GOBBETTI, M.; GANZLE, M. **Handbook on Sourdough Biotechnology**. Nova York: Springer, 2013. Cap. 2, p. 11-45. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5425-0>.

KONG, X.; ZHOU, H.; QIAN, H. Enzymatic hydrolysis of wheat gluten by proteases and properties of the resulting hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 102, p. 759–763, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.06.062>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814606004808>>. Acesso em: 10 Abril 2018.

LATIF, S.; MULLER, J. Potential of cassava leaves in human nutrition: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 44, p. 147-158, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.04.006>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224415000990>>. Acesso em: 20 Outubro 2018.

LEE, N.-Y.; KOO, J.-G. Effects of high hydrostatic pressure on quality changes of blends with low-protein wheat and oat flour and derivative foods. **Food Chemistry**, v. 271, p. 685-690, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.171>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814618313281>>. Acesso em: 7 Janeiro 2019.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. Princípios de bioquímica. 2ª ed. São Paulo: Sarvier, 1995. Cap. 8, p. 147-157.

LEMOS, J. D. A. *et al.* Isolamento e Identificação de Fungos em farinhas de milho e mandioca em Goiânia (Goiás). **Revista de Patologia Tropical**, v. 30, p. 31-36, 2001. DOI: <https://doi.org/10.5216/rpt.v30i1.15793>. Disponível em: <<https://www.revistas.ufg.br/iptsp/article/view/15793>>. Acesso em: 17 Abril 2018.

LEON, A.; ROSELL, C. M.; BARBER, C. B. D. A differential scanning calorimetry study of wheat proteins. **European Food Research and Technology**, p. 13-16, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00217-003-0699-y>. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00217-003-0699-y>>. Acesso em: 02 Agosto 2018.

LI, S.-J. *et al.* Novel natural compounds from endophytic fungi with anticancer activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 156, p. 316-343, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.07.015>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523418305713>>. Acesso em: 05 Janeiro 2019.

LIN, S.; HE, C. A mini-review on the enzyme-mediated manipulation of proteins/peptides. **Chinese Chemical Letters**, v. 29, p. 1017-1021, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2018.05.006>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1001841718301931>>. Acesso em: 20 Novembro 2018.

LOZANO, J. C.; BOOTH R. H. Diseases of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **PANS Pest Articles & News Summaries**, v. 20, p. 30-54, 1974. DOI: <https://doi.org/10.1080/09670877409412334>. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09670877409412334>>. Acesso em: 02 Maio 2019.

LYNCH, K. M.; COFFEY, A.; ARENDT, E. K. Exopolysaccharide producing lactic acid bacteria: Their techno-functional role and potential application in gluten-free bread products. **Food Research International**, v. 110, p. 52-61, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.03.012>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096399691730100X>>. Acesso em: 06 Janeiro 2019.

MAMO, J.; ASSEFA, F. The Role of Microbial Aspartic Protease Enzyme in Food and Beverage Industries. **Journal of Food Quality**, p. 1-15, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1155/2018/7957269>. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/jfq/2018/7957269/>>. Acesso em: 12 Maio 2019.

MANDARINO, J. M. G. Componentes do Trigo: Características Físico-Químicas, Funcionais e Tecnológicas. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA**, 1994. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/460386/componentes-do-trigo-caracteristicas-fisico-quimicas-funcionais-e-tecnologicas>>. Acesso em: 20 Fevereiro 2018.

MANGANYI, M. C. *et al.* Phylogenetic analysis and diversity of novel endophytic fungi isolated from medicinal plant *Sceletium tortuosum*. **Phytochemistry Letters**, v. 27, p. 36-43, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2018.06.004>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874390018301150>>. Acesso em: 9 Janeiro 2019.

MARQUES, N. P. *et al.* Cellulases and xylanases production by endophytic fungi by solid state fermentation using lignocellulosic substrates and enzymatic saccharification of pretreated sugarcane bagasse. **Industrial Crops and Products**, v. 122, p. 66-75, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.05.022>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669018304333>>. Acesso em: 8 Janeiro 2019.

MASSON, P.; TOMÉ, D.; POPINEAU, Y. Peptic Hydrolysis of Gluten, Glutenin and Gliadin from Wheat Grain: Kinetics and Characterisation of Peptides. **Science of Food and Agriculture**, v. 37, n. 12, p. 1223-1235, 1986. DOI: <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740371212>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jsfa.2740371212>>. Acesso em: 14 Janeiro 2019.

MATSUWAKI, Y. et al. Recognition of fungal protease activities induces cellular activation and eosinophil-derived neurotoxin release in human eosinophils. **The Journal of Immunology**, v. 183, p. 6708-6716, 2009. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901220>. Disponível em: <https://www.jimmunol.org/content/183/10/6708>>. Acesso em: 19 Maio 2019.

M'HIR, S. *et al.* Use of selected enterococci and *Rhizopus oryzae* proteases to hydrolyse wheat proteins responsible for celiac disease. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, p. 421-431, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.04008.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2672.2008.04008.x>>. Acesso em: 17 Dezembro 2018.

MOKASHE, N.; CHAUDHARI, B.; PATIL, U. Operative utility of salt-stable proteases of halophilic and halotolerant bacteria in the biotechnology sector. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 117, p. 493-522, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.217>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014181301830864X>>. Acesso em: 20 Dezembro 2018.

MONTSERRAT, V. *et al.* Influence of dietary components on *Aspergillus niger* prolyl endoprotease mediated gluten degradation. **Food Chemistry**, v. 174, p. 440-445, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.053>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814614017828>>. Acesso em: 15 Julho 2018.

MORALES-ORTEGA, A. et al. Los arabinoxilanos ferulados de cereales. Una revisión de sus características fisicoquímicas y capacidad gelificante. **Revista fitotecnia mexicana**, v. 36, p. 439-446, 2013. Disponível em: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802013000400010>. Acesso em: 20 Maio 2019.

MORRISON, L. A.; WRIGLEY, C. W. Taxonomic classification of grain species. **Reference Module in Food Science**, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.00002-0>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780081005965000020?via%3Dihub>>. Acesso em: 09 Maio 2019.

MULLER, S.; WIESER, H. The Location of Disulphide Bonds in Monomeric γ -type Gliadins. **Journal of Cereal Science**, v. 26, p. 169-176, 1997. DOI: [https://doi.org/10.1006/S0733-5210\(97\)90100-4](https://doi.org/10.1006/S0733-5210(97)90100-4). Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0733521097901004>>. Acesso em: 02 Março 2018.

MURAO, S.; FUNAKOSHI, S.; ODA, K. Purification, Crystallization and Some Enzymatic Properties of Acid Protease of *Cladosporium* sp. No. 45–2. **Agricultural and Biological Chemistry**, p. 1327-1333, 1972. DOI: <https://doi.org/10.1080/00021369.1972.10860407>. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00021369.1972.10860407>>. Acesso em: 08 Dezembro 2018.

MURI, E. M. F. Proteases Virais: Importantes alvos terapêuticos de compostos peptideomiméticos. **Química Nova**, v. 37, p. 308-316, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20140052>. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422014000200019&script=sci_abstract&tlng=pt>. Acesso em: 12 Maio 2019.

MUSSI-DIAS, V. *et al.* Fungos endofíticos associados a plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, p. 261-266, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-05722012000200002>. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516-05722012000200002&script=sci_abstract&tlng=pt>. Acesso em: 14 Abril 2018.

NASCIMENTO, I. S. B. D. **Partição de glutenina de farinha de trigo especial em sistemas aquosos bifásicos**. 2008. 55 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração Engenharia de Processos de Alimentos) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, 2008. Disponível em: <<http://www2.uesb.br/ppg/ppgecal/wp-content/uploads/2017/04/INGRID-BARBERINO.pdf>>. Acesso em: 14 Abril 2018.

NGOBISA, A. I. C. N. *et al.* Isolation and identification of some pathogenic fungi associated with cassava (*Manihot esculenta* Crantz) root rot disease in Cameroon. **African Journal of Agricultural Research**, v. 10, p. 4538-4542, 2015. DOI: <https://doi.org/10.5897/AJAR2015.10272>. Disponível em: <http://www.academicjournals.org/journal/AJAR/article-abstract/1E3ACFF56305>>. Acesso em: 10 Outubro 2018.

NIGHTINGALE, M. J. *et al.* Fusarium Head Blight: Effect of Fungal Proteases on Wheat Storage Proteins. **Cereal Chemistry**, v. 76, p. 150-158, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1094/CCHEM.1999.76.1.150> Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1094/CCHEM.1999.76.1.150>>. Acesso em: 17 Dezembro 2018.

NITSAWABG, S.; HATTI-KAUL, R.; KANASAWUD, P. Purification of papain from Carica papaya latex: Aqueous two-phase extraction versus two-step salt precipitation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 5, p. 1103-1107, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.02.013>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014102290600086X>>. Acesso em: 10 Janeiro 2019.

ORLANDELLI, R. C. *et al.* Antifungal and proteolytic activities of endophytic fungi isolated from Piper hispidum Sw. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, p. 359-366, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-838246220131042>. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822015000200359>. Acesso em: 06 Dezembro 2018.

OYEYINKA, S. A. *et al.* Physicochemical properties of gari prepared from frozen cassava roots. **LWT - Food Science and Technology**, v. 99, p. 594-599, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.10.004>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643818308223>>. Acesso em: 03 Janeiro 2019.

PARTICLE SCIENCES. Protein Structure, v. 8, 2009. Disponível em: https://www.particlesciences.com/docs/technical_briefs/TB_8.pdf>. Acesso em: 20 Agosto 2018.

PONGENER, C. *et al.* Adsorption of fluoride onto activated carbon synthesized from Manihot esculenta biomass—Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 6, p. 2382-2389, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.02.045>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213343718301179>>. Acesso em: 5 Janeiro 2019.

RAJAMANI, T. *et al.* Distribution and diversity of foliar endophytic fungi in the mangroves of Andaman Islands, India. **Fungal Ecology**, v. 36, p. 109-116, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2018.09.007>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1754504818302551>>. Acesso em: 05 Janeiro 2019.

RAJESH, P. S.; RAI, V. R. Hydrolytic enzymes and quorum sensing inhibitors from endophytic fungi of *Ventilago madraspatana* Gaertn. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, p. 120-124, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2013.01.002>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878818113000108>>. Acesso em: 08 Dezembro 2018.

RAJPUT, K.; CHANYAL, S.; AGRAWAL, P. K. Optimization of Protease Production by Endophytic Fungus *Alternaria alternata* isolated from Gymnosperm tree - *Cupressus torulosa* D. don. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 7, p. 1034-1054, 2016. Disponível em: <<https://www.wjpps.com/download/article/1467266416.pdf>>. Acesso em: 18 Dezembro 2018.

RAO, M.B. *et al.* Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 597-635, Setembro 1998. DOI: Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC98927/>>. Acesso em: 06 Janeiro 2019.

REEVES, T. G.; THOMAS, G.; RAMSAY, G. Save and Grow in Practice: Maize, Rice and Wheat. **Agriculture Organization of the United Nations**, 2016. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i4009e.pdf>>. Acesso em: 20 Março 2018.

REZAEI, S.; NAJAFI, M. A.; HADDADI, T. Effect of fermentation process, wheat bran size and replacement level on some characteristics of wheat bran, dough, and high-fiber Tafton bread. **Journal of Cereal Science**, v. 85, p. 56-61, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2018.11.019>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0733521017308457>>. Acesso em: 07 Janeiro 2019.

RIBEIRO, M. *et al.* Next-generation therapies for celiac disease: The gluten-targeted approaches. **Trends in Food Science & Technology**, v. 75, p. 56-71, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.02.021>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224417306866>>. Acesso em: 18 Dezembro 2018.

RODARTE, M. P. *et al.* Proteolytic activities of bacteria, yeasts and filamentous fungi isolated from coffee fruit (*Coffea arabica* L.). **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 33, p. 457-464, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.4025/actasciagron.v33i3.6734>. Disponível em: <<http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciAgron/article/view/6734>>. Acesso em: 06 Dezembro 2018.

ROLDÃO, G. M.; PFENNING, L. H. Caracterização e identificação de fungos endofíticos em grãos verdes de café (*Coffea arabica* L.). II Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, Vitória. **Anais eletrônicos**, Vitória, 2001. Disponível em: <http://www.sapc.embrapa.br/arquivos/consorcio/spcb_anais/simposio2/doenca03.pdf>. Acesso em: 06 Dezembro 2018.

ROSELL, C. M. *et al.* Cereals for developing gluten-free products and analytical tools for gluten detection. **Journal of Cereal Science**, v. 59, p. 354-364, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2013.10.001>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0733521013001598>>. Acesso em: 20 Abril 2018.

RUBAL-PEACE, G.; SEPP, C. Addressing Barriers for Patients with Celiac Disease When Assessing for Gluten in Medications. **Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics**, v. 118, n. 8, p. 1365-1369, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jand.2018.03.022>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2212267218304775>>. Acesso em: 05 Setembro 2018.

RUSSO, M. L. *et al.* Effect of endophytic entomopathogenic fungi on soybean *Glycine max* (L.) Merr. growth and yield. **Journal of King Saud University – Science**, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2018.04.008>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1018364717313848>>. Acesso em: 5 Janeiro 2019.

SÁNCHEZ, A. S. *et al.* Waste bio-refineries for the cassava starch industry: New trends and review of alternatives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 73, p. 1265-1275, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.02.007>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032117302095>>. Acesso em: 14 Outubro 2018.

SAPONE, A. *et al.* Spectrum of gluten-related disorders: consensus on new nomenclature and classification. **BMC Medicine**, v. 10, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1186/1741-7015-10-13>. Disponível em: <<https://bmcmmedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/1741-7015-10-13>>. Acesso em: 27 Janeiro 2019.

SARAN, S.; ISAR, J.; SAXENA, R. K. A modified method for the detection of microbial proteases on agar plates using tannic acid. **Biochemical and Biophysical Methods**, v. 70, p. 697–699, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2007.03.005>.

Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165022X07000759>>. Acesso em: 21 Maio 2018.

SAVI, L. K. **Caracterização térmica por calorimetria exploratória diferencial (DSC) das frações ricas em glutenina do trigo (*Triticum aestivum*, Cultivar BRS-Parrudo) obtidas por diferentes métodos de extração**. 2014, 68 p.

Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014. Disponível em:

<<https://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/37380>>. Acesso em: 21 Maio 2018.

SCHALK, K. *et al.* Isolation and characterization of gluten protein types from wheat, rye, barley and oats for use as reference materials. **PLoS ONE**, v. 12, p. e0172819, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172819>. Disponível em: <

<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0172819>>. Acesso em: 23 Março 2018.

SDEPANIAN, V. L.; MORAIS, M. B. D.; FAGUNDES-NETO, U. Doença celíaca: a evolução dos conhecimentos desde sua centenária descrição original até os dias atuais, **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 36, p. 244-257, 1999. DOI:

<http://dx.doi.org/10.1590/S0004-28031999000400013>. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-28031999000400013&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 17 Fevereiro 2018.

SEAB. Prognóstico Mandioca 2017/18, 2017. Disponível em:

<http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/2018/Mandioca_2017_18.pdf>. Acesso em: 25 Janeiro 2019.

SHAN, L. *et al.* Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. **Science**, v. 297, p. 2275-2279, 2002. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12351792>>. Acesso em: 19 Maio 2019.

SHETTY, R. *et al.* Discovery, cloning and characterisation of proline specific prolyl endopeptidase, a gluten degrading thermo-stable enzyme from *Sphaerobacter thermophiles*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 107, p. 57-63, 2017. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2017.08.002>. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022917301515?via%3Dihub>>. Acesso em: 04 Setembro 2018.

SHEWRY, P. R.; HALFORD, N. G. Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 370, p. 947-958, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.370.947>. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jxb/article/53/370/947/537249>>. Acesso em: 20 Abril 2018.

SHEWRY, P. R.; HALFORD, N. G.; TATHAM, A. S. The high molecular weight subunits of wheat glutenin and their role in determining wheat processing properties. **Advances in food and nutrition research**, v. 45, p. 219-302, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1043-4526\(03\)45006-7](https://doi.org/10.1016/S1043-4526(03)45006-7). Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043452603450067>>. Acesso em: 20 Junho 2018.

SHOMER, I. *et al.* Heat Coagulation of Wheat Flour Albumins and Globulins, their Structure and Temperature Fractionation. **Journal of Cereal Science**, v. 22, p. 237-249, 1995. DOI: <https://doi.org/10.1006/jcrs.1995.0060>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0733521085700604>>. Acesso em: 02 Agosto 2018.

SHOMER, I. *et al.* Ultrastructure of Consecutively Extracted and Flocculated Gliadins and Glutenins. **Journal of Cereal Science**, v. 27, p. 27-26, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1006/jcrs.1997.0143> Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0733521097901430>>. Acesso em: 02 Agosto 2018.

SILVA, T. S. G.; FURLANETTO, T. W. Diagnóstico de doença celíaca em adultos. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, p. 122-126, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-42302010000100027>. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42302010000100027>. Acesso em: 02 Agosto 2018.

SOUZA, A. Q. L. D. *et al.* Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. **Acta Amazonia**, v. 34, n. 2, p. 185-195, 2004. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0044-59672004000200006>. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/aa/v34n2/v34n2a05>>. Acesso em: 12 Junho 2018.

STAUFFER, C. E. Princípios da formação da massa. In: CAUVAIN, S. P.; YOUNG, L. S. **Tecnologia da panificação**. [S.l.]: Manole, 2007. p. 313-347.

STILES, C. M.; OUDEMANS, P. V. Distribution of Cranberry Fruit-Rotting Fungi in New Jersey and Evidence for Nonspecific Host Resistance. **Phytopathology**, v. 89, p. 218-225, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1999.89.3.218>. Disponível em: < <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PHYTO.1999.89.3.218>>. Acesso em: 3 Dezembro 2018.

STOVEN, S.; MURRAY, J. A.; MARIETTA, E. Celiac Disease: Advances in Treatment via Gluten Modification. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 10, n. 8, p. 859-862, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2012.06.005>. Disponível em: < [https://www.cghjournal.org/article/S1542-3565\(12\)00699-4/fulltext](https://www.cghjournal.org/article/S1542-3565(12)00699-4/fulltext) >. Acesso em: 04 Outubro 2018.

SULAIMAN, N. S. *et al.* Optimization of activated carbon preparation from cassava stem using response surface methodology on surface area and yield. **Journal of Cleaner Production**, v. 198, p. 1422-1430, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.07.061>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959652618320341>>. Acesso em: 4 Dezembro 2018.

SUNITHA, V. H.; NIRMALADEVI, D.; SRINIVAS, C. Extracellular Enzymatic Activity of Endophytic Fungal Strains Isolated from Medicinal Plants. **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 9, p. 01-09, 2013. Disponível em: <[https://idosi.org/wjas/wjas9\(1\)13/1.pdf](https://idosi.org/wjas/wjas9(1)13/1.pdf)>. Acesso em: 23 Novembro 2018.

TAPPIBAN, P. *et al.* Recent understanding of starch biosynthesis in cassava for quality improvement: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 83, p. 167-180, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.11.019>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224418305053>>. Acesso em: 05 Janeiro 2019.

TOGHUEO, R. M. K. *et al.* Enzymatic activity of endophytic fungi from the medicinal plants *Terminalia catappa*, *Terminalia mantaly* and *Cananga odorata*. **South African Journal of Botany**, v. 109, p. 146-153, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2016.12.021>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S025462991630031X>>. Acesso em: 20 Abril 2018.

TORO, M. A. N. D.; GARCÍA-CARREÑO, F. L. Evaluation of the Progress of Protein Hydrolysis. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, p. B2.2.1-B2.2.14, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1002/0471142913.fab0202s10>. Disponível em: < <https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/0471142913.fab0202s10>>. Acesso em: 12 Setembro 2018.

TORRES, B. B. Elementos de Enzimologia. In: BORZANI, W., *et al.* **Biotecnologia Industrial**. 1. ed. São Paulo: Blucher, v. 1, 2001. Cap. 5, p. 170.

TOSI, P. *et al.* Gradients in compositions in the starchy endosperm of wheat have implications for milling and processing. **Food Science & Technology**, v. 82, p. 1-7, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.09.027>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224418301055>>. Acesso em: 07 Janeiro 2019.

VALUEVA, T. A. *et al.* Serine Exoproteinases Secreted by the Pathogenic Fungi of Alternaria Genus. **Plant Pathology & Microbiology**, v. 6, nº 6, p. 1-7, 2015. DOI: Disponível em: <<https://www.omicsonline.org/open-access/serine-exoproteinases-secreted-by-the-pathogenic-fungi-of-alternaria-genus-2157-7471-1000272.php?aid=57139>>. Acesso em: 08 Dezembro 2018.

VIEGAS, A. P. Alguns fungos da mandioca. I. **Bragantia**, v. 3, p. 1-19, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0006-87051943000100001>. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0006-87051943000100001>. Acesso em: 02 Maio 2019.

VOJDANI, A.; VOJDANI, E. Gluten and non-gluten proteins of wheat as target antigens in autism, Crohn's and celiac disease. **Journal of Cereal Science**, v. 75, p. 252-260, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2017.04.010>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0733521017302059>>. Acesso em: 18 Março 2018.

WAREING, P. W. *et al.* Consumer preferences and fungal and mycotoxin contamination of dried cassava products from Ghana. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 36, p. 1-10, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.00419.x>. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2621.2001.00419.x>>. Acesso em: 18 Novembro 2018.

WERNECK, G. C. **Produção de Proteases por fungos endofíticos isolados de plantas do cerrado**. 2016, 88 p., Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade de Brasília, Brasília, 2016. Disponível em: <http://repositorio.unb.br/bitstream/10482/22096/1/2016_GabrielaCorezziWerneck.pdf>. Acesso em: 18 Novembro 2018.

WHITE, T. J. *et al.* Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. In: _____ **Pcr Protocols: a Guide to Methods and Applications**. [S.l.]: [s.n.], v. 31, 1990. p. 315-322. Disponível em: <<https://nature.berkeley.edu/brunslab/papers/white1990.pdf>>. Acesso em: 18 Novembro 2018.

WIESER, H. Chemistry of gluten proteins. **Food Microbiology**, v. 24, p. 115-119, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.07.004>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002006001535>>. Acesso em: 14 Fevereiro 2018.

WIESER, H. *et al.* Tryptophangehalt von Getreideproteinen. **Z Lebensm Unters Forsch**, p. 457–460, 1983. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF01409676> Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007%2FBF01409676?LI=true>>. Acesso em: 03 Julho 2018.

WIESER, H.; KOEHLER, P. The Biochemical Basis of Celiac Disease. **Cereal Chem**, v. 85, p. 1-13, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1094/CCHEM-85-1-0001>. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1094/CCHEM-85-1-0001>>. Acesso em: 29 Maio 2018.

WOLFE, S. L. **Introduction to cell and molecular biology**. 1. ed. Davis: Wadsworth Publishing Company, 1995.

WRIGLEY, C. W.; BEKES, F.; BUSHUK, W. Gluten: A Balance of Gliadin and Glutenin. In: BEKES, F. **Gliadin and Glutenin: The Unique Balance of Wheat Quality**. [S.l.]: [s.n.], 2006. Cap. 1, p. 3-32. Disponível em: <http://www.brockwell-bake.org.uk/docs/Gluten_A%20Balance%20of%20Gliadin%20and%20Glutenin.pdf>. Acesso em: 29 Maio 2018.

YADAV, P. *et al.* Carboxypeptidase in prolyl oligopeptidase family: Unique enzyme activation and substrate-screening mechanisms. **Journal of Biological Chemistry**, 2018. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/294/1/89>>. Acesso em: 8 Julho 2019.

YANG, G. *et al.* Diversity and communities of culturable endophytic fungi from different tree peonies (geoh herbs and non-geoh herbs), and their biosynthetic potential analysis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, p. 47-58, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2018.06.006>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1517838218302703?via%3Dihub>>. Acesso em: 06 Janeiro 2019.

ZAFERANLOO, B. *et al.* Optimization of protease production by endophytic fungus, *Alternaria alternata*, isolated from an Australian native plant. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 1755–1762, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1598-z>. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s11274-014-1598-z>>. Acesso em: 18 Maio 2019.

ZAINUDDIN, I. M. *et al.* Cassava post-harvest physiological deterioration: From triggers to symptoms. **Postharvest Biology and Technology**, v. 142, p. 115-123, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2017.09.004>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925521417300613>>. Acesso em: 25 Setembro 2018.

ZANPHORLIN, L. M. *et al.* Purification and characterization of a new alkaline serine protease from the thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 2137 - 2143, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.08.014>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511311002893>>. Acesso em: 18 Maio 2019.

ZEILINGER, S.; MARTÍN, J.-F.; GARCÍA-ESTRADA, C. **Biosynthesis and Molecular Genetics of Fungal Secondary Metabolites**. [S.l.]: [s.n.], v. 2, 2015.

ZENG, L. *et al.* Biochar and crushed straw additions affect cadmium absorption in cassava-peanut intercropping system. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 167, p. 520-530, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.10.003>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651318310145>>. Acesso em: 06 Janeiro 2019.

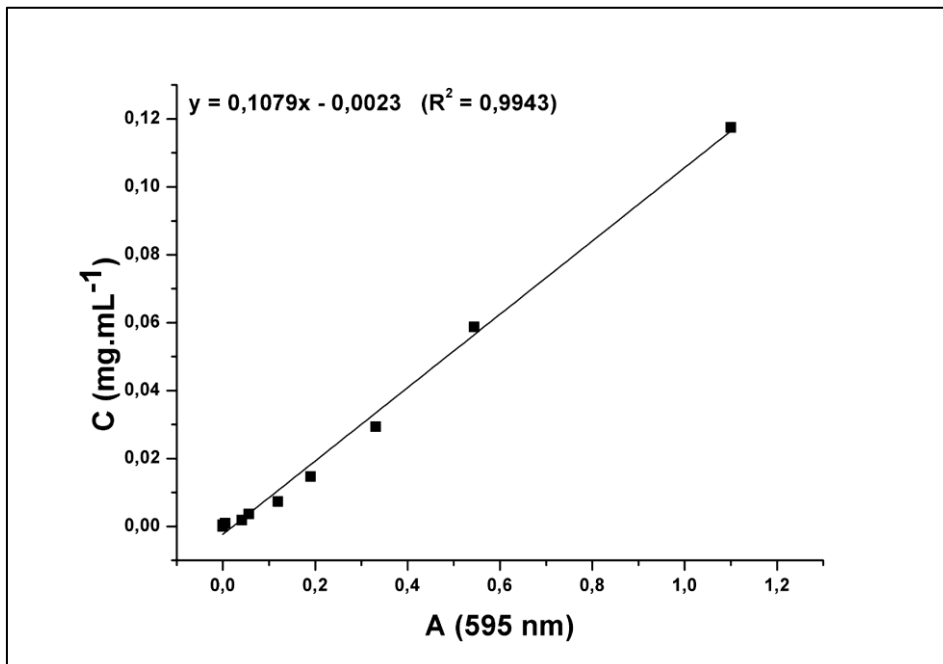
ZHANG, H. *et al.* Preparation and modification of high dietary fiber flour: A review. **Food Research International**, v. 113, p. 24-35, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.06.068>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996918305234>>. Acesso em: 04 Janeiro 2019.

APÊNDICE A - Dados referentes a dosagem proteica

Tabela 21 - Soluções utilizadas em uma das dosagens proteicas

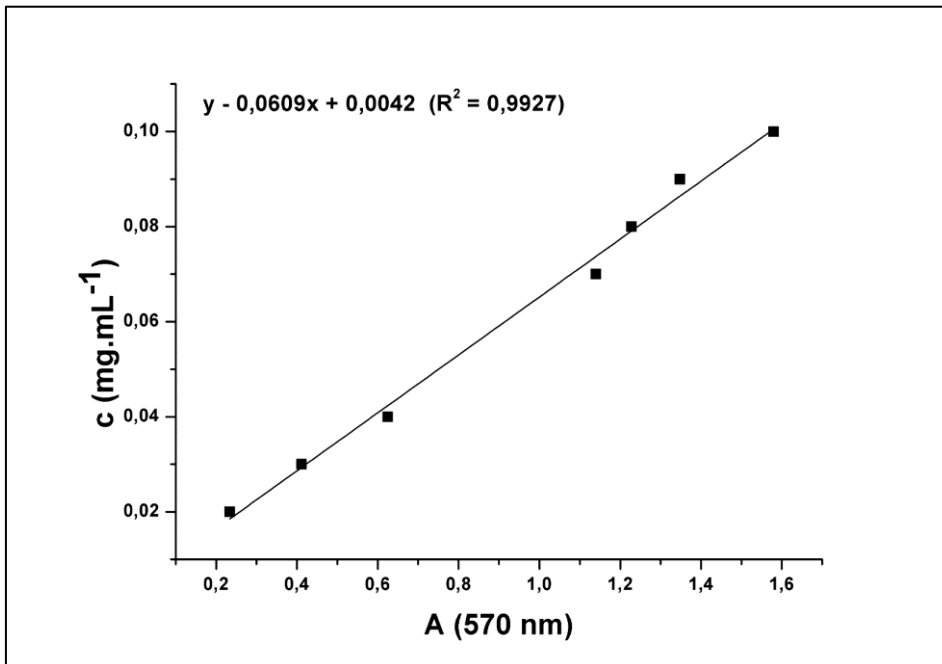
A	C (mg/mL)
0	0
0,0000	0,0005
0,0050	0,0009
0,0410	0,0018
0,0560	0,0037
0,1190	0,0073
0,1900	0,0147
0,3310	0,0294
0,5440	0,0588
1,1000	0,1175

Figura 46 - Exemplo de curva de calibração utilizada na dosagem proteica



APÊNDICE B - Dados referentes ao cálculo de hidróliseTabela 22 - Soluções aquosas padrão de *L*-leucina

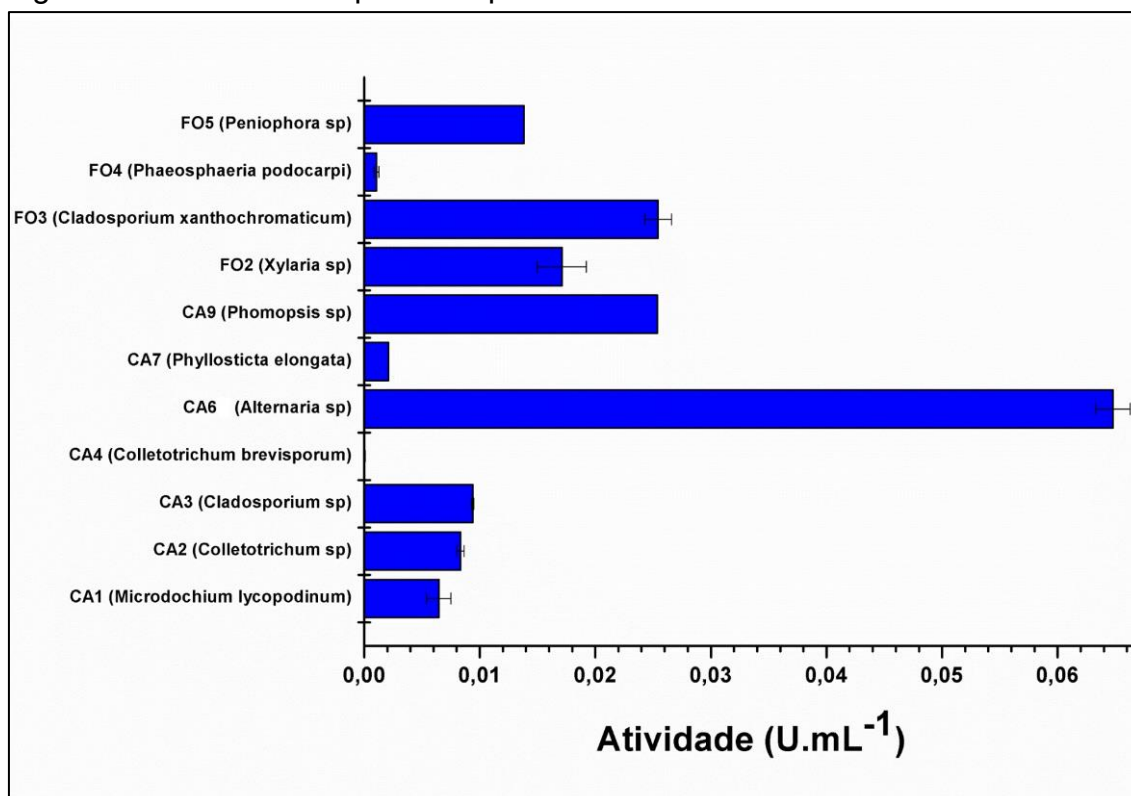
A (570 nm)	C (mg/mL)
0,234	0,02
0,412	0,03
0,625	0,04
1,14	0,07
1,228	0,08
1,348	0,09
1,58	0,10

Figura 47 - Curva da concentração de *L*-Leucina vs absorvância a 570 nm

APÊNDICE C - Dados de atividade por mL dos extratos

Extratos	Valor Branco (abs 430 nm)	Valor A (abs 430 nm)	Valor B (abs 430 nm)	U/mL (A)	U/mL (B)	U/mL (Média)	Desvio Padrão
FO5 (<i>Peniophora</i> sp)	0,025	0,117	0,117	0,014	0,014	0,014	0,000
FO4 (<i>Phaeosphaeria podocarpi</i>)	0,016	0,022	0,024	0,001	0,001	0,001	0,000
FO3 (<i>Cladosporium xanthochromaticum</i>)	0,129	0,304	0,293	0,026	0,025	0,025	0,001
FO2 (<i>Xylaria</i> sp)	0,016	0,120	0,140	0,016	0,019	0,017	0,002
CA9 (<i>Phomopsis</i> sp)	0,038	0,207	0,207	0,025	0,025	0,025	0,000
CA7 (<i>Phyllosticta elongata</i>)	0,006	0,020	0,020	0,002	0,002	0,002	0,000
CA6 (<i>Alternaria</i> sp)	0,107	0,546	0,532	0,066	0,064	0,065	0,002
CA4 (<i>Colletotrichum brevisporum</i>)	0,417	0,162	0,163	0,000	0,000	0,000	0,000
CA3 (<i>Cladosporium</i> sp)	0,025	0,087	0,088	0,009	0,010	0,009	0,000
CA2 (<i>Colletotrichum</i> sp)	0,038	0,092	0,095	0,008	0,009	0,008	0,000
CA1 (<i>Microdochium lycopodium</i>)	0,059	0,107	0,097	0,007	0,006	0,007	0,001

Figura 48 - Atividade de protease por mL de extrato

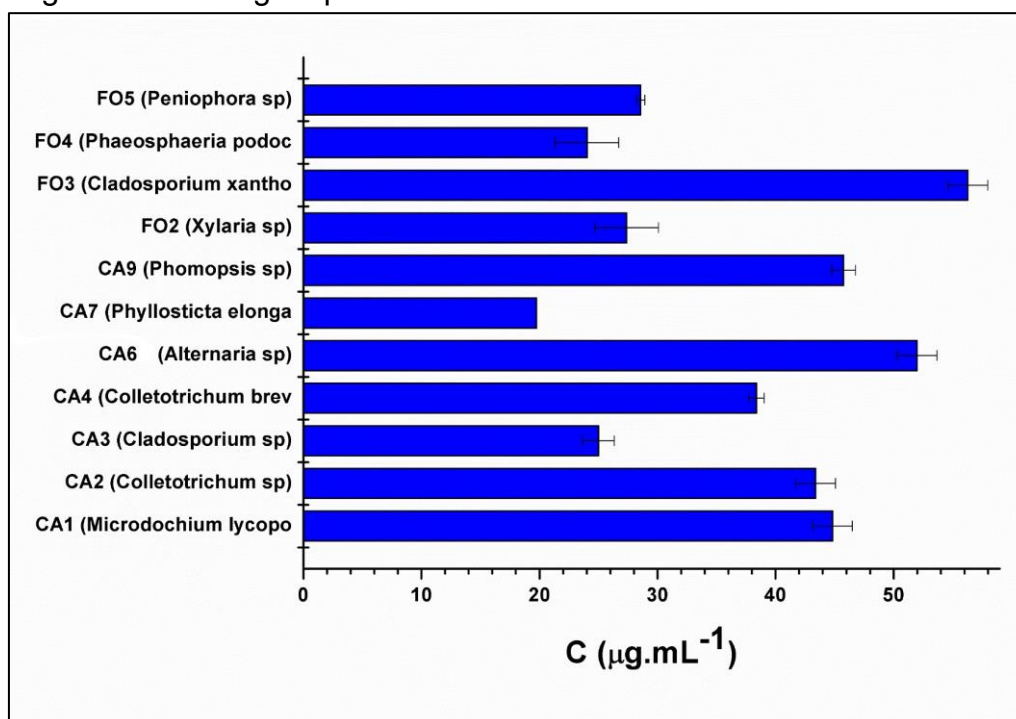


Fonte: Autor.

APÊNDICE D - Dados de dosagem proteica dos extratos enzimáticos

Extratos	Valor A (abs 595 nm)	Valor B (abs 595 nm)	C (A) (mg/mL)	C (B) (mg/mL)	C (Média) (mg/mL)	Desvio Padrão
FO5 (<i>Peniophora</i> sp)	0,090	0,089	0,030	0,029	0,030	0,000
FO4 (<i>Phaeosphaeria podocarpi</i>)	0,084	0,076	0,027	0,024	0,025	0,002
FO3 (<i>Cladosporium xanthochromaticum</i>)	0,150	0,145	0,056	0,053	0,055	0,002
FO2 (<i>Xylaria</i> sp)	0,083	0,091	0,027	0,030	0,028	0,002
CA9 (<i>Phomopsis</i> sp)	0,124	0,127	0,044	0,046	0,045	0,001
CA7 (<i>Phyllosticta elongata</i>)	0,071	0,071	0,021	0,021	0,022	0,000
CA6 (<i>Alternaria</i> sp)	0,136	0,141	0,050	0,052	0,051	0,002
CA4 (<i>Colletotrichum brevisporum</i>)	0,111	0,109	0,039	0,038	0,038	0,001
CA3 (<i>Cladosporium</i> sp)	0,080	0,084	0,025	0,027	0,026	0,001
CA2 (<i>Colletotrichum</i> sp)	0,118	0,123	0,042	0,044	0,043	0,002
CA1 (<i>Microdochium lycopodium</i>)	0,121	0,126	0,043	0,045	0,044	0,002

Figura 49 - Dosagem proteica dos extratos enzimáticos obtidos



Fonte: Autor.

APÊNDICE E - Hidrólise das frações proteicas pelo fungo CA6

Amostra	Valor Branco (Abs 570 nm)	Valor A (Abs 570 nm)	Valor B (Abs 570 nm)	Concentração Aminoácidos A (mg/mL)	Concentração Aminoácidos B (mg/mL)	Concentração Aminoácidos Média (mg/mL)	Desvio Padrão
Extrato CA6	0,043	-	-	-	-	-	-
Albumina	0,920	-	-	-	-	-	-
Globulina	0,014	-	-	-	-	-	-
Gliadina	0,000	-	-	-	-	-	-
Glutenina	0,004	-	-	-	-	-	-
Farinha de Trigo	0,340	-	-	-	-	-	-
Reação Albumina	-	1,500	1,380	0,037	0,030	0,033	0,005
Reação Globulina	-	0,290	0,307	0,019	0,020	0,019	0,001
Reação Gliadina	-	1,100	1,071	0,069	0,067	0,068	0,001
Reação Glutenina	-	1,368	1,200	0,085	0,075	0,080	0,007
Reação F. Trigo	-	1,780	1,800	0,089	0,091	0,090	0,001

APÊNDICE F - pH de cultivo do fungo CA6

	Branco Fungo	Branco F. Trigo	ABS 570 nm A	ABS 570 nm B	Concentração Aminoácidos A (mg/mL)	Concentração Aminoácidos B (mg/mL)	Concentração Aminoácidos Média (mg/mL)	Desvio Padrão
pH 2 EXT	0,395	0,058	0,547	0,550	0,056	0,056	0,056	0,000
pH 2 INT	0,135	0,058	0,450	0,403	0,084	0,076	0,080	0,006
pH 3 EXT	0,743	0,058	0,860	0,870	0,050	0,051	0,050	0,001
pH 3 INT	0,147	0,058	0,748	0,739	0,133	0,131	0,132	0,001
pH 4 EXT	0,827	0,058	0,750	0,770	0,016	0,020	0,018	0,002
pH 4 INT	0,176	0,058	0,672	0,650	0,115	0,111	0,113	0,003
pH 5 EXT	0,739	0,058	0,570	0,600	0,000	0,006	0,003	0,004
pH 5 INT	0,201	0,058	0,630	0,600	0,103	0,098	0,101	0,004
pH 6 EXT	0,717	0,058	0,670	0,650	0,021	0,018	0,020	0,002
pH 6 INT	0,191	0,058	0,350	0,329	0,057	0,053	0,055	0,003
pH 8 EXT	0,573	0,058	0,469	0,470	0,012	0,012	0,012	0,000
pH 8 INT	0,126	0,058	0,307	0,300	0,061	0,059	0,060	0,001
pH 10 EXT	0,483	0,058	0,48	0,490	0,029	0,031	0,030	0,001
pH 10 INT	0,128	0,058	0,330	0,320	0,064	0,062	0,063	0,001

APÊNDICE G - Tempo de hidrólise da farinha de trigo

Tempo (h)	ABS 570 nm A	ABS 570 nm B	Concentração Aminoácidos A (mg/mL)	Concentração Aminoácidos B (mg/mL)	Concentração Aminoácidos Média (mg/mL)	Desvio Padrão
0	0,104	-	0,057	0,057		-
1	0,120	0,125	0,003	0,004	0,003	0,000
2	0,143	0,158	0,007	0,009	0,008	0,001
4	0,196	0,200	0,016	0,017	0,016	0,000
6	0,300	0,296	0,034	0,033	0,033	0,000
8	0,410	0,400	0,053	0,051	0,052	0,001
10	0,470	0,470	0,063	0,063	0,063	0,000
12	0,532	0,515	0,074	0,071	0,072	0,001
16	0,770	0,750	0,115	0,111	0,113	0,001
24	1,130	1,220	0,177	0,192	0,184	0,005
34	1,140	1,150	0,190	0,191	0,191	0,001

APÊNDICE H - pH ótimo de hidrólise da farinha de trigo

pH	Branco Fungo	Branco F.Trigo	ABS 570 nm A	ABS 570 nm B	Concentração Aminoácidos A (mg/mL)	Concentração Aminoácidos B (mg/mL)	Concentração Aminoácidos Média (mg/mL)	Desvio Padrão
2	0,072	0,285	0,324	0,335	0,022	0,023	0,022	0,001
3	0,072	0,240	0,620	0,630	0,063	0,065	0,064	0,001
4	0,072	0,167	0,505	0,490	0,058	0,056	0,057	0,001
5	0,072	0,088	0,132	0,150	0,022	0,025	0,023	0,002

APÊNDICE I - Precipitação salina

	ABS 570 nm A	ABS 570 nm B	C. Aminoácidos A ((mg/mL)/0,25 mL precipitado)	C. Aminoácidos B ((mg/mL)/0,25 mL precipitado)	C. Aminoácidos Média ((mg/mL)/0,25 mL precipitado)	Desvio Padrão
0%	0,191	0,191	0,203	0,203	0,203	0,000
25%	0,014	0,015	0,050	0,051	0,051	0,001
50%	0,037	0,037	0,070	0,070	0,070	0,000
75%	0,330	0,325	0,322	0,318	0,320	0,003
75% SOB	0,165	0,140	0,180	0,159	0,169	0,015

APÊNDICE J - Concentração proteica dos precipitados

	ABS 595 nm A	ABS 595 nm B	C. Proteínas A (mg/mL precipitado)	C. Proteínas B (mg/ mL precipitado)	C. Proteínas Média (mg/mL precipitado)	Desvio Padrão
0%	0,536	0,526	0,095	0,093	0,094	0,001
25%	0,373	0,359	0,065	0,063	0,064	0,002
50%	0,634	0,617	0,113	0,110	0,111	0,002
75%	1,234	1,231	0,223	0,222	0,222	0,000
75% SOB	0,475	0,465	0,084	0,082	0,083	0,001

APÊNDICE K - Atividade específica dos precipitados

	Volume de precipitado utilizado na reação (mL)	Total de aminoácidos para 10 mL de meio reacional A (mg)	Total de aminoácidos para 10 mL de meio reacional B (mg)	Total de Proteínas no precipitado A (mg proteínas)	Total de Proteínas no precipitado B (mg proteínas)	Atividade A (mg aminoácido /mg proteína)	Atividade B (mg aminoácido /mg proteína)	Atividade média (mg aminoácido /mg proteína)	Desvio
0%	100,000	810,029	810,029	9,499	9,316	85,277	86,952	86,115	1,185
25%	2,000	4,034	4,103	0,130	0,125	30,957	32,773	31,865	1,284
50%	2,000	5,615	5,615	0,226	0,220	24,863	25,568	25,216	0,498
75%	2,000	25,755	25,411	0,445	0,444	57,818	57,188	57,503	0,446
75% SOB	100,000	720,672	634,752	8,383	8,200	85,973	77,414	81,693	6,053