

ATIVIDADE DE HIDROLISADO PROTÉICO DE PENAS FRENTE AO HERPESVÍRUS

ALINE EBELING VIANA¹; CLARISSA CAETANO DE CASTRO²; DÉBORA SCOPEL E SILVA²; ROBERTA FONTOURA³; AMANDA DE SOUZA DA MOTTA³; SILVIA DE OLIVEIRA HUBNER⁴

¹ Universidade Federal de Pelotas; linehviana@gmail.com

² Universidade Federal de Pelotas; clarissac.decastro@gmail.com

³ Universidade Federal do Rio Grande do Sul

⁴ Universidade Federal de Pelotas; silviaohubner@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Os herpesvírus constituem os principais responsáveis por infecções nos homens e animais, especialmente em indivíduos imunodeprimidos. Entretanto há uma grande limitação de medicamentos antivirais disponíveis para estas afecções e, por isso, atualmente, diversos testes têm sido realizados na busca de substâncias que apresentem ação antiviral (GARRÉ et al., 2007).

As penas de aves constituem o principal resíduo da indústria avícola e pode ser utilizado na forma de farinha de penas como importante fonte proteica (STEINER, et al., 1983). Diversas bactérias tem demonstrado capacidade de degradação de penas de forma eficiente, e esse processo biológico é considerado uma estratégia de gerir e agregar valor aos materiais ricos em queratina (GUPTA & RAMNANI, 2006).

Mais recentemente, foi observado que alguns carotenóides extraídos das penas de frango possuem atividade antimicrobiana, especialmente contra *Escherichia coli*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Bacillus subtilis* (PRIYA & MAHESWARI, 2012).

Atividade antimicrobiana das penas também foi descrita por SÁNCHEZ et al. (2013), os quais relataram que a carga bacteriana na casca do ovo de *Hirundo rustica* está relacionada as propriedades das penas utilizadas como forro nos ninhos.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a possibilidade de atividade antiviral de um hidrolisado de penas frente ao herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1), *in vitro*.

2. METODOLOGIA

As penas de galinha foram fornecidas por uma indústria local de aves domésticas (Avipal, Porto Alegre, RS, Brasil). O hidrolisado de penas foi obtido frente à incubação com *Chryseobacterium* sp. kr6, a qual produz queratinases alcalinas, conforme o modo descrito por FONTOURA et al. (2014). Nos ensaios foram utilizadas proteínas solúveis obtidas durante o crescimento de meio contendo penas (50 g/L) com *Chryseobacterium* sp. kr6 a 30°C. Após centrifugação e filtração a concentração proteica foi avaliada pelo reagente Folin-Ciocalteau (LOWRY, et al., 1951).

Para avaliação de atividade antiviral foi realizada titulação viral na presença ou ausência do hidrolisado em concentração não citotóxica. A atividade antiviral foi analisada comparando a diferença entre o título viral nas células tratadas e não tratadas e expressa pelo percentual de inibição viral (PI). O PI foi calculado pela fórmula: $PI = [1 - (T \text{ antilogarítmico}/C \text{ antilogarítmico})] \times 100$ (NISHIMURA et al., 1977).

A citotoxicidade foi avaliada pelo ensaio de vermelho neutro (BORENFREUND & PUERNER, 1985) após 72 h e incubação. A porcentagem de células viáveis foi calculada mediante a fórmula $AT/AC \times 100$, sendo AT e AC a absorbância dos tratados e a absorbância dos controles, respectivamente (VAUCHER et al., 2010). As leituras das densidades ópticas foram quantificadas em espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm. A citotoxicidade foi expressa como concentração citotóxica 90% (CC90%). Nos ensaios foi utilizada a concentração de hidrolisado em que as células MDBK (*Madin Derby bovine kidney*) apresentaram viabilidade acima de 90%.

Células MDBK foram cultivadas em microplacas utilizando meio essencial mínimo (MEM) com 6% de soro fetal bovino e, após 24 h e observação de confluência foram utilizadas para titulação do BoHV-1, cepa Los Angeles (LA), na presença ou ausência do hidrolisado de penas em concentração não citotóxica. Os títulos virais foram calculados pelo método de diluição limitante, e expressos como dose infectante a 50% do tecido celular em $100\mu\text{L}$ ($TCID_{50}/100\mu\text{L}$) após 72h de incubação a 37°C . Os ensaios foram realizados em triplicata.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No estudo foi utilizado o hidrolisado de penas coletado após 48 h de incubação com a *Chryseobacterium* sp. kr6. Esse hidrolisado apresentou uma concentração proteica de 18 mg/mL. A análise por eletroforese em SDS-PAGE mostra a presença de proteínas de baixo peso molecular (Figura 1).

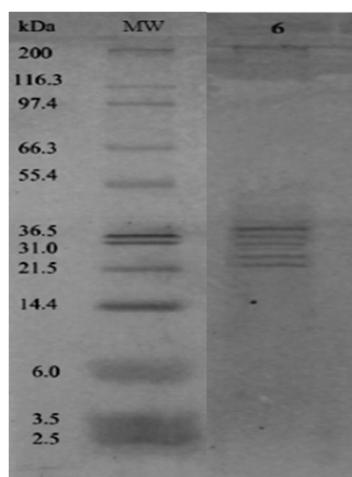


Figura 1: Análise por eletroforese em SDS-PAGE.(MW) marcador de peso molecular; (6) amostra de hidrolisado de penas.

O hidrolisado de penas não apresentou toxicidade a partir de 0,018 mg/mL quando avaliado pelo ensaio do vermelho neutro nas células MDBK. Tal concentração foi utilizada para avaliação da atividade antiviral.

A amostra LA do BoHV-1 apresentou um título médio de $10^{5,8}$ $TCID_{50}/100\mu\text{L}$ após 72 h de incubação nas células. Quando a titulação foi realizada na presença do hidrolisado de penas (0,018 mg/mL) o título médio apresentado foi $10^{4,7}$ $TCID_{50}/100\mu\text{L}$, uma diferença significativa estatisticamente ($p < 0,05$). Os valores obtidos permitiram detectar um PI - de 90,66%.

A farinha de penas contém alto teor de proteína bruta (WILLIAMS et al., 1991). Diversos hidrolisados proteicos produzidos por hidrolise enzimática demonstram atividades biológicas, que geralmente estão relacionadas a peptídeos bioativos (KORHONEN & PIHLANTO, 2006).

Os peptídeos bioativos são fragmentos específicos de proteína que apresentam um impacto positivo nas funções ou condições corporais, influenciando, assim, a saúde humana. Apesar de não ter sido avaliada neste estudo qual a molécula responsável por essa ação acredita-se que esteja atribuída aos peptídeos bioativos, pois diversas propriedades são associadas a essas estruturas, como: atividade antimicrobiana e antiviral, atividade redutora da pressão sanguínea, habilidade na redução do colesterol, atividade antitrombótica e antioxidante, melhoria na absorção/biodisponibilidade dos minerais, efeitos cito ou imunomodulatórios e antitumoral, (PIHLANTO, 2001; KITTS & WEILER, 2003; HARTMANN & MEISEL, 2007).

4. CONCLUSÕES

O uso do hidrolisado de penas demonstrou uma redução significativa no título do BoHV-1 em células MDBK quando comparado aos ensaios realizados na ausência do hidrolisado. Desta forma, pode-se concluir que o hidrolisado de penas com seus peptídeos obtidos podem ser potencialmente utilizados como fonte direta de moléculas biologicamente ativas ou indiretamente como uma fonte de informação para síntese química de peptídeos bioativos podendo levar ao desenvolvimento de novas drogas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BORENFREUND, E.; PUERNER, J.A. A simple quantitative procedure using monolayer culture for toxicity assays (HTD/NR-90). **Journal of Tissue Culture Methods**, v. 9, p. 7-9, 1985.
- FONTOURA, R.; DAROIT, D.J.; CORREA, A.P.F.; MEIRA, S.M.M.; MOSQUERA, M.; BRANDELLI, A.. Production of feather hydrolysates with antioxidant, angiotensin-I converting enzyme and dipeptidyl peptidase IV inhibitory activities. **New Biotechnology**, v. 31, n. 5, 2014.
- GARRÉ B.; VAN DER MEULEN K.; NUGENT J.; NEYTS J.; CROUBELSB S.; DE BACKERBAND, P.; NAUWYNCK, H. *In vitro* susceptibility of six isolates of equine herpesvirus 1 to acyclovir, ganciclovir, cidofovir, adefovir, PMEDAP and foscarnet. **Veterinary Microbiology**, 122(1/2), p. 43-51, 2007.
- GUPTA, R.; BEG, Q.K.; LORENZ, P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.59, p.15-32, 2002.
- HARTMANN, R.; MEISEL, H. Food derived peptides with biological activity: from research to food applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v.18, p.163-169, 2007.
- KITTS, D.D.; WEILER, K. Bioactive proteins and peptides from food sources. Application of bioprocesses used in isolation and recovery. **Current Pharmaceutical Design**, v.9, p.1309-1323, 2003.
- KORHONEN, H.; PIHLANTO, A. Bioactive peptides: production and functionality. **International Dairy Journal**, v.16(9), p.945-960, 2006.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J.; Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal Biological Chemistry**, v. 75, p. 193-265, 1951.

NISHIMURA, T., TOKU, H., FUKUYASU, H. Antiviral activity of amidinohydrazones of alkoxyphenyl-substituted carbonyl compounds against influenza virus in eggs and in mice. **Kitasato Archives of Experimental Medicine XII Antiviral compounds**. v. 50, p. 39-46, 1977.

PRIYA, S.; MAHESWARI, P. Carotenoids from the feathers waste of *Gallus gallus* and its antimicrobial activity. **EM International**. v. 31, n. 4, p. 507-509, 2012.

PIHLANTO, A. Antioxidative peptides derived from milk proteins. **International Dairy Journal**, v.16, p.1306-1314, 2006.

SÁNCHEZ, J. M. P.; SOLER, J. J.; PLATERO, A. M. M.; KNIGHT, R.; BUENO, M. M.; MØLLER, A. P. Eggshell Bacterial Load Is Related to Antimicrobial Properties of Feathers Lining Barn Swallow Nests. **Microbial Ecology**. v. 67, n. 2, p. 480-487, 2014.

STEINER, R. J.; KELLEMS, R. O.; CHURCH, D. C. Feather and hair meals for ruminants. IV. Effects of chemical treatment of feather and processing time on digestibility. **Journal of Animal Science**, v. 57, n. 2, p. 495-502, 1983.

VAUCHER, R.A.; TEIXEIRA, M.L.; BRANDELLI, A. Investigation of the citotoxicity of antimicrobial peptide P40 on eukaryotic cells. **Current Microbiology** v. 60, p. 1-5, 2010.

WILLIAMS, C.M. et al; Evaluation of a bacterial feather fermentation product, feather lysate, as a feed protein. **Poultry Science**, Savoy, v.70, p.85-94, 1991.