



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

WELLINGTON LEAL DOS SANTOS

PROSPECÇÃO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS
PEPTÍDEOS OBTIDOS A PARTIR DA PROTEÓLISE DO CASEINATO DE
RUMINANTES

RECIFE – PE

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

WELLINGTON LEAL DOS SANTOS

PROSPECÇÃO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS
PEPTÍDEOS OBTIDOS A PARTIR DA PROTEÓLISE DO CASEINATO DE
RUMINANTES

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biociência Animal da Universidade
Federal Rural de Pernambuco, como
pré-requisito necessário para a
obtenção do grau de Mestre em
Biociência Animal. Área de
concentração: Biotecnologia

Orientadora: Keila Aparecida Moreira – UAG/UFRPE

RECIFE – PE

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

S237p Santos, Wellington Leal dos.
Prospecção e avaliação das atividades biológicas dos peptídeos
obtidos a partir da proteólise do caseinato de ruminantes / Wellington
Leal dos Santos. – Recife, 2018.
102 f. : il.

Orientador(a): Keila Aparecida Moreira.
Dissertação (Mestrado em Biociência Animal) – Universidade
Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia
e Fisiologia Animal, Recife, 2018.
Referencias e apêndices.

1. Peptídeos bioativos 2. Hidrolisado proteico 3. Leite
4. Caseína 5. Protease I. Moreira, Keila Aparecida, orient. II. Título

CDD 636.089

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

Parecer da comissão examinadora da defesa de dissertação de mestrado de

WELLINGTON LEAL DOS SANTOS

Prospecção e avaliação das atividades biológicas dos peptídeos obtidos a partir da proteólise do caseinato de ruminantes

Área de concentração: Biotecnologia

Recife, 27 de fevereiro de 2018

Dissertação apresentada e aprovada pela comissão examinadora:

Profa. Dra Keila Aparecida Moreira (Presidente)

Unidade Acadêmica de Garanhuns – UFRPE

Profa. Dra Daniele Silva Ribeiro (Membro Externo)

Unidade Acadêmica de Garanhuns – UFRPE

Profa. Dra Lidiane Roberta Cruz da Silva (Membro Externo)

PNPD/ FACEPE/CAPES - UFRPE

Aos meus pais, **Maria Ferreira dos Santos** e **José Leal dos Santos**, por serem exemplos e modelos de conduta, pelo amor incondicional, respeito e que não mediram esforços para que esta conquista se tornasse real.

As minhas irmãs, **Cícera Leal Gonçalves** e **Fabiana Leal dos Santos**, por serem duas guerreiras, por me apoiarem, aceitarem e nunca deixarem que eu abandonasse meu sonho.

DEDICO!!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me concedido o dom da vida e por guiar meus caminhos durante essa conquista, por ter me dado forças quando pensei em abandonar tudo por temer a incerteza do futuro e não acreditar em mim.

Aos meus guardiões e guias espirituais. Vocês que sempre estiveram comigo, sobretudo, nos momentos em que eu mais precisei: por meio de energia, intuição e força. Vocês me ajudaram a seguir quando eu não acreditava mais.

Aos meus orixás pela harmonia entre meus amigos de caminhada, pela força da minha fé, pela determinação, força e coragem para prosseguir mesmo quando era difícil sair da cama e por minha saúde. E a Umbanda pela oportunidade de evoluir.

Aos meus pais pelo grande exemplo, por serem minha fortaleza e que mesmo distantes reconheço todo o esforço, carinho e dedicação que tem comigo.

A todas as vítimas de LGBTfobia. Suas lutas não foram em vão. Obrigado por me ensinarem a EXISTIR, RESISTIR, LUTAR e SOBREVIVER todos os dias. E que apesar de todo sofrimento buscam força de superação e a capacidade de encontrar a Vida em meio às situações mais desesperadoras. Muito obrigado a todos os que nos antecederam, que nos possibilitaram ocupar ambientes que antes nos foram negados. Que a nossa luta continue. E que possamos ver a luz do sol e ter uma vida digna. Muito obrigado a vocês, ilustres desconhecidos. A dignidade pertence a nós.

À professora Keila Moreira, pela orientação científica e pessoal, pelo carinho, por ter me ajudado a completar mais uma importante jornada na minha vida. Vejo nela, um exemplo de comprometimento com a ciência e com a vida.

À Camila pelo carinho, amor, amizade, companheirismo, por vezes ser minhas mãos e meu cérebro, pelos *help* (inclusive de madrugada), por diversas vezes ser meu anjo da guarda. A ela devo parte do meu amadurecimento e crescimento profissional, científico e de vivência, obrigado por me ensinar a amar o que fazemos independente de qualquer coisa.

À Alana e Melry pela amizade, companheirismo, carinho, dedicação e amor. Algumas amizades transcendem a existência nesse mundo e nesse período vocês me deram força para continuar mesmo quando o corpo pedia para não sair da cama. Vejo em vocês, um exemplo de profissionais, de luta, de força e de coragem e vamos segurar a marimba!

À Giselle Woolley, Kallyanne Brasil, e Lais Santos pela irmandade, companheirismo, apoio, amor incondicional e por fazer acreditar em mim todos os dias até quando eu não acreditava, tenho nelas um exemplo de determinação, humanidade, humildade e sentimento de justiça.

A Edson e Natália que desde o período de iniciação científica se tornaram grandes amigos. Pela força, pelo apoio, pelo companheirismo, pela confiança, a Edson pela ajuda nos experimentos finais e, sobretudo aos dois pela amizade.

A Dhiego Soares, Elvis Ciríaco, Eudes Carvalho Jeff Mattos, John David e Moza Almeida pelas gargalhadas, companhias durante a madrugada, pela leveza, por me darem forças para continuar mesmo que involuntariamente.

À Bianca, Bruna Candido e Bruna Figueredo, Camilla Lira, Jouse, Luiza e Sanara pelas palavras de incentivo, por torcerem por mim e por emprestarem seus ouvidos vocês têm um papel fundamental na construção desse sonho.

Aos meus amigos-irmãos Ana Maria, Jadiel, Rosangela e Thamires e pelo apoio, pelos abraços e por toda a força durante essa jornada, por me ensinarem que a vida não tem necessariamente que ser levada a sério e que grandes amizades não necessitam de presença física constante.

Aos meus amigos do Laboratório de Biotecnologia e do grupo Bioativos Aline, Alana, Anna Carolina, Daniele, João Tiago, Joyce, Milene, Neide, Pablo e Thailan pela companhia durante os dias de trabalhos, pelas risadas, pelo apoio e por serem meus pilares. Em vocês tenho exemplos de profissionais.

Aos meus colegas do Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, em especial a Andressa, Edson, Giselle, Givanildo, Jéssica, Laís, Karla, Kétsia e Nivaldo pela companhia e pelo carinho. Vejo neles exemplo de compromisso profissional e com a sociedade.

A Leonardo Borges pela companhia, apoio, risos e força durante o último ano dessa jornada.

Ao prof. Rinaldo Mota e a Edna Cherias pela paciência, disponibilidade e apoio durante o tempo de realização da pós-graduação. À Universidade Federal Rural de Pernambuco e, em especial, ao Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – Programa de Pós-graduação em Biociência Animal pela oportunidade de realização do mestrado.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

A todos aqueles que direta ou indiretamente me ajudaram ou incentivaram nessa jornada.

A todos vocês o meu muito obrigado (*adúapé!*)

*“O que me impede de sorrir
É tudo que já eu perdi
Eu fechei os olhos e pedi
Para quando abrir a dor não estar aqui, mas
Sei que não é fácil assim, mas
Vou aprender no fim
Minhas mãos se unem para que
Tirem do meu peito o que é de ruim
E vou dizendo*

*Tudo vai ficar bem
E as minhas lágrimas vão secar
Tudo vai ficar bem
E essas feridas vão se curar”*

Pablo Vittar

*“E no final, assim, calado, eu sei que
vou ser coroado rei de mim.”*

Los Hermanos

*“Um novo tempo há de vencer
Pra que a gente possa florescer
E baby amar, amar
Sem temer!”*

Johnny Hoocker e Liniker

RESUMO

Os peptídeos bioativos, principalmente oriundos da hidrólise enzimática da caseína do leite, apresentam efeitos antioxidantes, anti-hipertensivos, antidiabéticos, capacidade de se ligar a metais e capacidade antimicrobiana. O leite, de modo geral apresenta em sua composição a caseína uma fonte importante de fragmentos proteicos com atividade biológica expressiva, sendo assim, objetivou-se investigar o potencial biológico de peptídeos derivados da caseína bovina, bubalina e caprina submetidos à ação proteolítica da bromelina, papaína, neutrase e tripsina a fim de selecionar o hidrolisado com maior potencial antioxidante; fracionar o hidrolisado selecionado e avaliar o potencial antioxidante e antidiabético das frações. Foi possível observar diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os caseinatos apresentando grau de hidrólise mínimo de 2% (bovino) e máximo de 85% (bubalino). Em relação as atividades antioxidantes observaram-se comportamento distintos dos caseinatos frente aos diferentes tratamentos enzimáticos ao longo de 480 minutos. Os hidrolisados apresentaram potencial para o sequestro dos radicais hidroxila (entre 0 e 100%), superóxido (superior a 80%), 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico - ABTS (superior a 85%), 2,2-difenil-1-picrilidrazil - DPPH (entre 20 e 95%) e quelar ferro (entre 10 e 100%) e cobre (entre 14 e 80%). No que se referente as atividades antioxidantes dos fracionados provenientes da espécie selecionada (bubalina), os testes hidroxila e DPPH apresentaram maior potencial de eliminação nas frações de 3-10 kDa e <3 kDa, variando de acordo com a especificidade enzimática, enquanto que o maior potencial de sequestro do radical ABTS foi observado na fração contendo o hidrolisado total. Para a atividade quelante de ferro foi observado quelação superior a 70% em todas as frações destacando-se as frações < 3 kDa. Já para quelação de cobre foram observados valores superiores a 60% nas frações >10 kDa. A atividade antidiabética apresentou potencial variável em relação a inibição da α -glicosidase entre as frações, enquanto que a α -amilase foi melhor inibida pela fração <3 kDa. Observou-se atividade antibacteriana entre 3,28 e 100% de inibição contra os micro-organismos testados, a fração <3 kDa apresentou maior potencial inibitório. A atividade anti-hipertensiva das frações manteve-se entre 39,35 e 89,58%, destacando-se a fração peptídica H3. As proteases empregadas na hidrólise dos caseinatos apresentaram potencial para obtenção de hidrolisados com as três espécies avaliadas de fragmentos proteicos antioxidantes. Além disso, apresentaram a capacidade de produzir frações de hidrolisados com potencial antioxidante, antidiabético, anti-hipertensivo e antimicrobiano, portanto o método de ultrafiltração se mostrou eficaz no fracionamento de peptídeos com diferentes massas molares. Desta forma pode-se evidenciar que os hidrolisados totais das três espécies bem como as frações da espécie bubalina apresentam potente atividade antioxidante, o que indica potencial aplicação alimentar seja como alimento funcional, nutracêutico ou como aditivo alimentício natural.

Palavras-chave: peptídeos bioativos, hidrolisado proteico, leite, caseína, protease.

ABSTRACT

Bioactive peptides, mainly derived from the enzymatic hydrolysis of milk casein, antioxidants, antihypertensives, antidiabetics, ability to isolate metals and antimicrobial capacity. The milk, in general, presents in its composition casein an important source of protein fragments with expressive biological activity. Thus, the objective was to investigate the biological potential of peptides derived from bovine casein, buffalo and caprine submitted to the proteolytic action of bromelain, papain, neutrase and trypsin in order to select the hydrolyzate with the highest antioxidant potential; fractionating the selected hydrolyzate and evaluating the antioxidant and antidiabetic potential of the fractions. It was possible to observe significant differences ($p < 0.05$) between caseinates presenting a minimum degree of hydrolysis of 2% (bovine) and maximum of 85% (buffalo). In relation to the antioxidant activities, it was observed a distinct behavior of the caseinates against the different enzymatic treatments over 480 minutes. Hydrolysates presented a potential for sequestration of hydroxyl radicals (between 0 and 100%), superoxide (greater than 80%), ABTS (greater than 85%), DPPH (between 20 and 95%) and chelate iron (between 10 and 100%) and copper (between 14 and 80%); Regarding the antioxidant activities of the fractions from the selected species (buffalo), the hydroxyl and DPPH tests had a higher elimination potential in fractions of 3-10 kDa and <3 kDa, varying according to the enzymatic specificity, whereas the higher ABTS radical sequestration potential was observed in the fraction containing the total hydrolyzate. For the chelating activity of iron, it was observed more than 70% chelation in all the fractions, emphasizing the fractions <3 kDa. For copper chelation, values higher than 60% were observed in fractions >10 kDa. The antidiabetic activity had a variable potential in relation to the α -glycosidase inhibition between the fractions, whereas α -amylase was better inhibited by the fraction <3 kDa. Antibacterial activity was observed between 3.28 and 100% inhibition against the microorganisms tested, the fraction <3 kDa showed a greater inhibitory potential. The antihypertensive activity of the fractions remained between 39.35 and 89.58%, especially the peptide fraction H3. The proteases used in the hydrolysis of caseinates presented the potential to obtain hydrolysates with the three evaluated species of antioxidant protein fragments. In addition, they showed the capacity to produce fractions of hydrolysates with antioxidant potential, antidiabetic, antihypertensive and antimicrobial, therefore the ultrafiltration method proved effective in the fractionation of peptides with different molar masses. In this way, the total hydrolysates of the three species as well as the fractions of the selected species present potent antioxidant activity, which proves potential food application as a functional food, nutraceutical or as a natural food additive.

Key words: bioactive peptide, protein hydrolysed, milk, casein, protease.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1.** Modelo esquemático da estrutura geral da micela de caseína.....24
- Figura 2.** Uso da hidrólise enzimática para liberação das frações da caseína e de peptídeos bioativos.....26
- Figura 3.** Funções fisiológicas dos peptídeos bioativos derivados de leite.....27
- Figura 4.** Função da enzima conversora da angiotensina I (ECA) no sistema renina angiotensina, participação no sistema calicreina-renina e atuação dos peptídeos bioativos sobre a ECA 35
- Figura 5.** Modelos dos mecanismos de indução a morte celular por peptídeos antibacterianos. Modelo barrel stave (A); Modelo carpet (B); e Modelo toroidal (C). Regiões hidrofóbicas dos peptídeos estão coloridas em azul e as hidrolíticas, coloridas em vermelho..... 38

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1. Composição do leite das espécies bovina, caprina e bubalina.....22

Tabela 2. Características individuais das frações de caseína com base no tipo e nas principais propriedades.....23

Quadro 1. Diferença entre diabetes tipo 1 (T1DM) e tipo T2DM)31

CAPITULO I

Tabela 1. Grau de hidrólise (%) dos hidrolisados obtidos pela ação de bromelina, papaína, tripsina e neutrase sobre a caseína do leite bubalino, bovino e caprino após 480 minutos de hidrólise..... 54

Tabela 2. Eliminação do radical hidroxila (%) dos hidrolisados obtidos pela ação de bromelina, papaína, tripsina e neutrase sobre a caseína do leite bubalino, bovino e caprino após 480 minutos de hidrólise..... 55

Tabela 3. Eliminação do radical superóxido (%) dos hidrolisados obtidos pela ação de bromelina, papaína, tripsina e neutrase sobre a caseína do leite bubalino, bovino e caprino após 8 horas de hidrólise..... 57

Tabela 4. Eliminação do radical DPPH (%) dos hidrolisados obtidos pela ação de bromelina, papaína, tripsina e neutrase sobre a caseína do leite bubalino, bovino e caprino após 480 minutos de hidrólise..... 58

Tabela 5. Eliminação do radical ABTS (%) dos hidrolisados obtidos pela ação de bromelina, papaína, tripsina e neutrase sobre a caseína do leite bubalino, bovino e caprino no período de 480 minutos de hidrólise..... 59

Tabela 6. Quelante de ferro (%) dos hidrolisados obtidos pela ação de bromelina, papaína, tripsina e neutrase sobre a caseína do leite bubalino, bovino e caprino após 480 minutos de hidrólise.....60

Tabela 7. Quelante de cobre (%) dos hidrolisados obtidos pela ação de bromelina, papaína, tripsina e neutrase sobre a caseína do leite bubalino, bovino e caprino no período de 480 minutos de hidrólise62

CAPITULO II

Tabela 1. Ensaio de eliminação dos radicais hidroxila, DPPH e ABTS (%) dos hidrolisados do caseinato bubalino e suas frações78

Tabela 2. Atividade quelante de ferro e cobre (%) dos hidrolisados do caseinato bubalino e suas frações obtidas a partir da hidrólise por diferentes proteases.....80

Tabela 3. Atividade antidiabética e anti-hipertensiva (%) dos hidrolisados do caseinato bubalino e suas frações obtidas a partir da hidrólise por diferentes enzimas proteolíticas.....82

Tabela 4. Atividade antibacteriana (%) dos hidrolisados do caseinato bubalino e suas frações obtidas a partir da hidrólise por diferentes enzimas proteolíticas.....83

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1	Leite de diferentes espécies: Produção, composição e características	22
2.2	Hidrólise enzimática e liberação de peptídeos bioativos	25
2.2.1	Peptídeos antioxidantes	27
2.2.2	Peptídeos antidiabéticos	30
2.2.3	Peptídeos anti-hipertensivos	32
2.2.4	Peptídeos antimicrobianos	35
3	OBJETIVOS	38
3.1	Objetivo geral	38
3.2	Objetivos específicos	38
	REFERÊNCIAS	39
	CAPITULO 1	46
	Prospecção e caracterização do potencial antioxidante de hidrolisados a partir de caseinatos de diferentes espécies animais por meio de hidrólise enzimática	46
	Resumo:	47
1	Introdução	48
2	Materiais e métodos	49
2.1	Obtenção da caseína do leite	49
2.2	Preparação dos hidrolisados de caseinato bovino, bulbalino e caprino empregando proteases comerciais	49
2.3	Determinação do grau de hidrólise	50
2.4	Determinação <i>in vitro</i> das atividades de eliminação de radicais livres dos hidrolisados	50
2.4.1	Atividade de eliminação do radical hidroxila	50
2.4.2	Atividade de eliminação do radical superóxido	51
2.4.3	Ensaio de antioxidante para atividade de eliminação do radical DPPH	51
2.4.4	Ensaio de antioxidante para atividade de eliminação do radical ABTS	52
2.4.5	Atividade quelante de Cu ²⁺ e Fe ²⁺	52
2.5	Análise estatística	53

3	Resultados e discussão	53
4	Conclusão	62
	Referências	63
	CAPITULO 2	67
	Fracionamento dos peptídeos derivados da caseína bubalina e caracterização das suas atividades antidiabética, antioxidante anti-hipertensiva e antibacteriana	67
	Resumo	68
1	Introdução	69
2	Materiais e métodos	70
2.1	Obtenção da caseína do leite e do soro de leite bubalino	70
2.2	Preparação dos hidrolisados e dos ultrafiltrados de caseinato bulbalino empregando hidrólise enzimática	70
2.3	Determinação <i>in vitro</i> das atividades de eliminação de radicais livres dos hidrolisados e das frações	71
2.3.1	Atividade de eliminação do radical hidroxila	71
2.3.2	Ensaio de antioxidante para atividade de eliminação do radical DPPH	71
2.3.3	Ensaio de antioxidante para atividade de eliminação do radical ABTS	72
2.3.4	Atividade quelante de Fe²⁺ e Cu²⁺ do hidrolisado e das frações dos peptídeos	72
2.4	Atividade inibitória da enzima α-glicosidase	73
2.5	Atividade inibitória da enzima α-amilase	73
2.6	Ensaio anti-hipertensivo <i>in vitro</i>	74
2.7	Atividade antibacteriana	75
2.8	Análise estatística	75
3	Resultados e discussão	75
4	Conclusão	83
	Referências	84
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	89
	APÊNDICE	90

1. INTRODUÇÃO

Inúmeras pesquisas são realizadas em busca de compostos bioativos, substâncias que fazem parte da constituição dos alimentos e que quando ingeridos participam de atividades regulatórias no organismo. A busca por novas fontes de alimentos ou componentes com propriedades funcionais baseia-se no interesse dos consumidores por alimentos saudáveis e pelo interesse da indústria farmacêutica e/ou alimentícia de obter e caracterizá-los (GIL-CHÁVEZ et al., 2013).

Dentre os compostos biológicos, enquadram-se alguns peptídeos bioativos, assim chamados devido as atividades regulatórias que exercem no organismo animal. Por definição, são pequenos fragmentos protéicos constituído por 2 e 20 aminoácidos, obtidos por meio de processos *in vitro* ou *in vivo*. Esses peptídeos encontram-se inativos dentro da proteína original devendo, portanto, ser liberados para que possam vir a exercer uma modulação nas funções fisiológicas, seja por meio da interação com receptores específicos, ou na indução de respostas fisiológicas (RYAN et al., 2011; RAIKOS; DASSIOS, 2013).

O interesse na produção comercial de peptídeos bioativos, principalmente àqueles resultantes da ação da proteólise enzimática da caseína do leite (KUMAR et al., 2013), vem aumentando devido aos efeitos benéficos que eles podem trazer ao organismo. Dentre as quais destacam-se os efeitos sobre o sistema imunológico, sistema diestório, cardiovascular por meio da atividade antimicrobiana, da capacidade de ligação com minerais da atividade antioxidante, anti-hipertensiva, respectivamente além das atividades anticancerígenas, opióides, antiobesidade entre outras, tem apresentado um aumento recente (SINGH et al., 2014).

Nos últimos anos, grande parte das pesquisas tem sido focada na geração de peptídeos bioativos a partir da hidrólise enzimática de proteínas encontradas comumente em fontes de alimentos (CARRASCO-CASTILLA et al., 2012; CHANG et al., 2013; STROOBANTS et al., 2014), sobretudo, proteína láctea que apresentem as mais diversas atividades biológicas podendo mitigar inúmeras doenças crônicas.

Os peptídeos antioxidantes têm como mecanismo de ação a doação de um elétron de hidrogênio para inativação ou eliminação dos processos oxidativos e formação dos radicais livres evitando a ocorrência de fisiopatologias associadas ao estresse oxidativo ou elevando o tempo de vida útil em prateleira.

Há diversos antioxidantes no mercado, sendo que, os sintéticos apresentam a desvantagem, que estão sobre legislação específica o que restringe seu uso, em virtude disso, os peptídeos alimentícios com capacidade antioxidantes têm merecido destaque, uma vez que, apresentam alta capacidade antioxidante, disponibilidade e segurança (GU et al., 2015; LIU et al., 2015; MARQUES et al., 2015).

Devido à alta ocorrência de diabetes na população mundial, tratamentos adequados são necessários e, comercialmente vários medicamentos já foram concebidos, entretanto apresentam inconvenientes, tais como tempo para o efeito desejado, edemas e ganho de peso; sendo urgente a busca por alternativas mais naturais com propriedades potentes e efeitos colaterais mínimos (CONNOLLY et al., 2014).

Nesse aspecto, alguns peptídeos apresentam também atividade antidiabética, podendo controlar o nível de glicose no sangue após as refeições através da inibição da α -amilase, enzima que catalisa os carboidratos de cadeia longa e da α -glicosidase, que catalisa a clivagem da glicose a partir de dissacarídeos; ambas inibições retardam a absorção da glicose, controlando o nível de glicose anteriormente mencionando (YU et al., 2012; CONNOLLY et al., 2014).

No que se refere a capacidade anti-hipertensiva, esta se dá em virtude da hipertensão ter tomado proporções epidêmicas afetando cerca de 30% da população adulta mundial, estando associado à doenças crônicas (47 a 50% das mortes mundiais) e de alto fator de risco como acidente vascular cerebral (13% das mortes mundialmente), infartos, doenças renais (OMS, 2012). A hipertensão é tratada principalmente com drogas comerciais que inibem a enzima conversora de angiotensina (ECA), como captopril, contudo peptídeos inibidores de ECA têm demonstrado potencial para uma forma alternativa de

tratamento, apresentado como diferencial a inexistência de efeitos colaterais, segurança e confiabilidade.

Peptídeos inibidores de ECA foram obtidos da hidrólise de diferentes alimentos, tais como a caseína, o leite, carne suína, de tubarão, soja, linhaça e muitos outros alimentos (BALTI et. al., 2015), apresentando não apenas a atividade anti-hipertensiva como também outras biofuncionalidades.

Alguns peptídeos originários da hidrólise da caseína presente no leite apresentam atividade antimicrobiana, e sabendo, que algumas bactérias que causam doenças, em humanos e animais têm desenvolvido resistência a antibióticos, sendo, portanto, indispensáveis alternativas a estes medicamentos (JABBARI et al., 2012).

Em virtude da necessidade de desenvolvimento e descoberta de medicamentos ou substâncias oriundas de produtos naturais, sobretudo, de origem alimentar, o uso de enzimas proteolíticas em estudos científicos tem se intensificado. Devido a capacidade multifuncional das sequências aminoacídicas obtidas a partir da hidrólise enzimática da caseína do leite que permite a liberação de pequenos fragmentos proteicos com atividade biológica que podem ser úteis a promoção da saúde.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Leite de diferentes espécies: Produção, composição e características

De acordo com a Instrução Normativa n. 62 de 2011 do Ministerio da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o leite é definido como:

O produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. O leite de outros animais deve denominar-se segundo a espécie de que proceda (BRASIL, 2011).

O leite e o colostro apresentam como função primária a nutrição e o fornecimento de proteção imunológica passiva aos neonatos, respectivamente, sobretudo em virtude da sua composição centesimal e suas propriedades, podendo servir seja individualmente, ou empregando um dos seus componentes como um importante ingrediente industrial (RANDHEERA et al., 2016).

De acordo com a Food and Agriculture Organization das Nações Unidas (FAO) em 2016 a produção de leite bovino representava cerca de 83% da produção mundial, seguida pela produção bubalina (13%) e caprina (2,3%), destacando o importante aumento na produção de leite bubalino devido ao maior percentual de sólidos totais (Tabela 1) que acaba repercutindo no aumento do rendimento industrial.

Tabela 1. Composição do leite das espécies bovina, caprina e bubalina.

Parâmetros	Espécies		
	<i>Bos tauros</i>	<i>Capra aegagrus</i>	<i>Bubalus bubalis</i>
Sólidos totais (%)	11,8 - 13,0	11,9-16,3	15,7-17,2
Proteína (%)	3,0 – 3,9	3,0-5,2	2,7-4,7
Relação caseína:soro	4,7	3,5	4,6
Gordura (%)	3,3 - 5,4	3,0-7,2	5,3-9,0
Lactose (%)	4,4 – 5,6	3,2-5,0	3,2-4,9
Cinzas (%)	0,7 – 0,8	0,7-0,9	0,8-0,9
Energia (kJ L ⁻¹)	2709 – 2843	2802-2894	4244-4779

Fonte: Park, 2009 (adaptado).

Existe uma grande semelhança em relação aos componentes encontrados no leite das diferentes espécies, sendo as diferenças principais, além das

listadas na tabela 1, associadas ao tamanho da caseína que é maior no leite bubalino, quando comparado ao bovino; os glóbulos de gordura que são menores no leite caprino quando comparado com leites das demais espécies e em relação a composição dos monômeros da caseína (PARK, 2009). Essa variação está associada a espécie, dieta, genética, raça do animal, idade, período de lactação, inter indivíduos (CARDOSO et al., 2017).

A caseína representa cerca de 80% da proteína láctea total nas diferentes espécies estando presente na proporção de 2,6 g.L⁻¹ (ATAMER et al., 2017) sendo geralmente caracterizada pela sua estabilidade ao calor, apresentando monômeros associados à sua estrutura coloidal (WALSTRA, 1990; SGARBIERI, 2005).

Há uma correlação entre as propriedades específicas a fração proteica (Tabela 2), caseína, que apresenta como uma das principais especificidades a precipitação em pH 4,6 variando entre as espécies e a fração da caseína que se deseja obter (O'MAHONY; FOX, 2013).

Tabela 2. Características individuais das frações de caseína com base no tipo e nas principais propriedades.

Característica	Tipo de caseína			
	α_{s1}	α_{s2}	B	K
Conformação original				
% no leite	1,2-1,5	0,3-0,4	0,9-1,1	0,3-0,4
Número de aminoácidos	199	207	209	169
Massa molecular	~23000	~ 25000	~24000	~19000
Localização no leite	Micela	Micela	Micela	Superfície micelar
Número de resíduos de prolina /cisteína	17/0	10/2	34-35/5	20/1
Número de grupos fosfato	8	10-13	5	1

Fonte: Adaptado e modificado de Kruif; Holt (2003); Sawyer, 2003; Brew, 2003; Ranadheera et al. (2016)

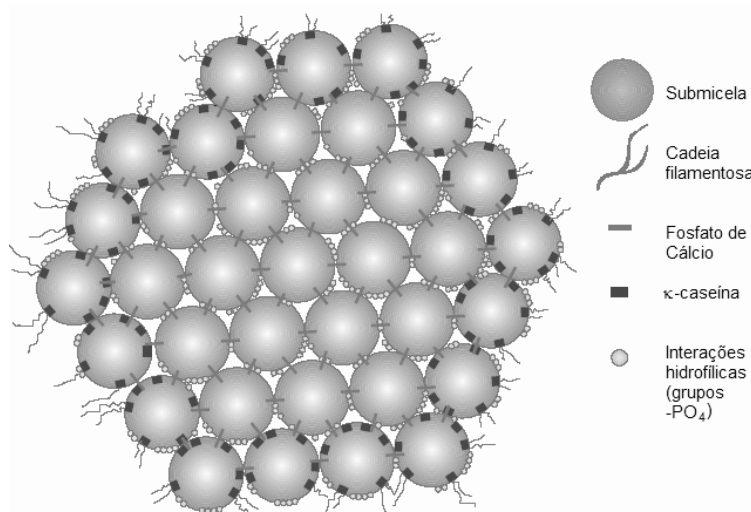
A proporção de α_{S1} - (~ 38%), α_{S2} - (~ 10%), β - (~ 34%) e κ -caseínas (~ 15%), podem ser empregadas tanto na forma de leite quanto dissociadas em caseinato na presença de sódio ou parcialmente hidrolisados empregando enzimas que catalisam proteína em peptídeos, podendo esses últimos

apresentarem atividade biológica (HERNANDEZ-LADESMA; DEL MAR CONTRERAS; RECIO, 2011).

Diversos modelos explicam a estrutura micelar, bem como a forma com que a caseína é montada, sobretudo, em decorrência das ligações de hidrogênio e das interações hidrofóbicas e eletrostáticas, favorecendo uma gama de aplicações industriais (BROYARD; GAUCHERON, 2015; ATAMER et al., 2017). Dentre os quais, destacam-se (Figura 1):

- a) O primeiro deles foi proposto por Slattery; Evard (1973) reformulado por Slattery (1976) denominado modelo sub-micela de Slattery ou modelo clássico;
- b) O modelo de dupla ligação estabelecido por Horne (1998) modificado pelo mesmo autor em 2003.
- c) Modelo de nano-cluster de Holt (1992) modificado e adaptado em 2004 e 2016.

Figura 1. Modelo esquemático da estrutura geral da micela de caseína



Fonte: Adaptada por SGARBIERI (2005).

Essas aplicações industriais estão correlacionadas às suas propriedades nutricionais (GOMEZ-RUIZ et al., 2008), funcionais (BELICIU; MORARU, 2013) e físico-químicas (MCCARTHY et al., 2014), outra aplicação que vem sendo amplamente estudada é para obtenção de peptídeos bioativos empregando

hidrólise enzimática (YAMADA et al., 2013; WU et al., 2013; SHANMUGAM et al., 2015; KUMAR et al. 2016)

2.2. Hidrólise enzimática e liberação de peptídeos bioativos

Na última década diversas pesquisas têm sido realizadas em busca de novos métodos de hidrólise para a obtenção e o isolamento de peptídeos bioativos a partir de proteínas de baixo custo, sobretudo proteínas de origem alimentar. A preparação de hidrolisados ricos em peptídeos bioativos, a partir do tratamento enzimático de proteínas originais, tem ganhado destaque devido ao aumento no valor agregado e menor eliminação de resíduos (ZAMBROWICZ et al., 2015).

O leite pode ser tratado como um sistema biológico complexo, sendo suas proteínas e suas sequências primárias fontes de peptídeos bioativos (GIACOMETTI; BURETIC-TOMLJANOVIC, 2017) o que tem impulsionado a diversos estudos nesta área.

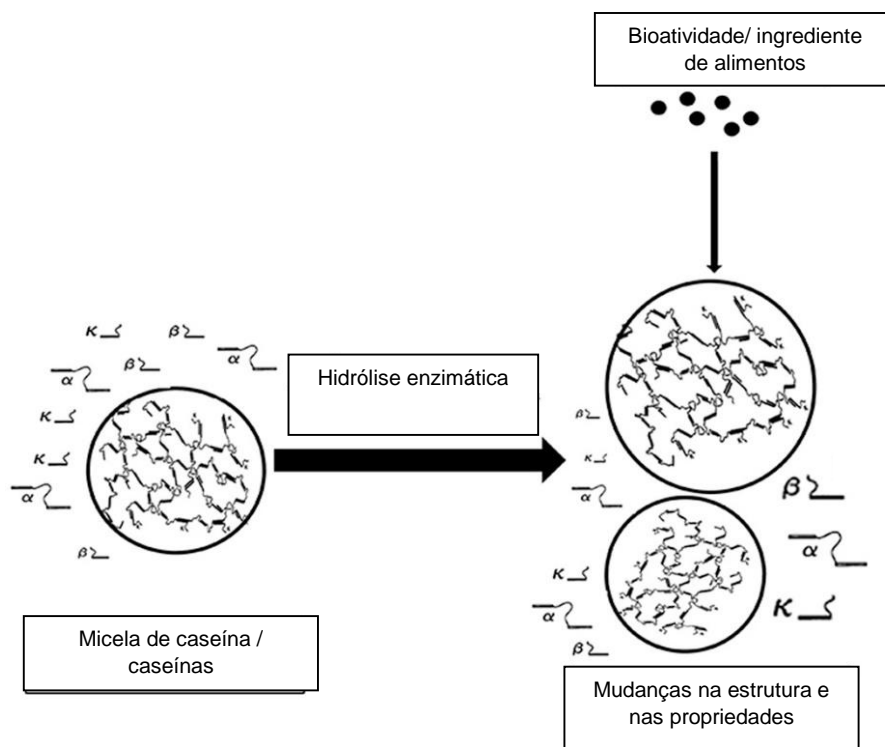
De acordo com Freitas et al. (2013) tem-se aumentado o interesse industrial e acadêmico na investigação de componentes derivados de alimentos que possam trazer benefícios a saúde, dentre os quais destaca-se os derivados da proteína do leite (SHAZLY et al., 2017); e que conseqüentemente podem prevenir ou mitigar a ocorrência e prevalência de doenças, dentre esses componentes destacam-se os peptídeos bioativos (TOLDRÁ et al., 2017), são peptídeos curtos, entre 2 a 20 aminoácidos que quando criptografados tornam-se ativos (RYAN et al., 2011; RAIKOS; DASSIOS, 2013).

Os peptídeos bioativos estão latentes na proteína do leite original, podendo estas bioatividades serem liberadas, *in vitro* ou *in vivo*, pela ação de enzimas proteolíticas, figura 2, específicas do processo digestivo (pepsina, tripsina, quimiotripsina), enzimas microbianas, de plantas e de animais ou pela ação das bactérias lácticas presentes no leite (RYAN et al., 2011; KUMAR et al., 2013; RAIKOS; DASSIOS, 2013).

A hidrólise proteica e conseqüente liberação dos peptídeos bioativos, que exibem uma ampla gama de funções, podem ser utilizados como potenciais ingredientes de alimentos funcionais garantindo uma promoção na melhoria da

qualidade de vida, denominados como peptídeos funcionais (GIL-CHÁVEZ et al., 2013).

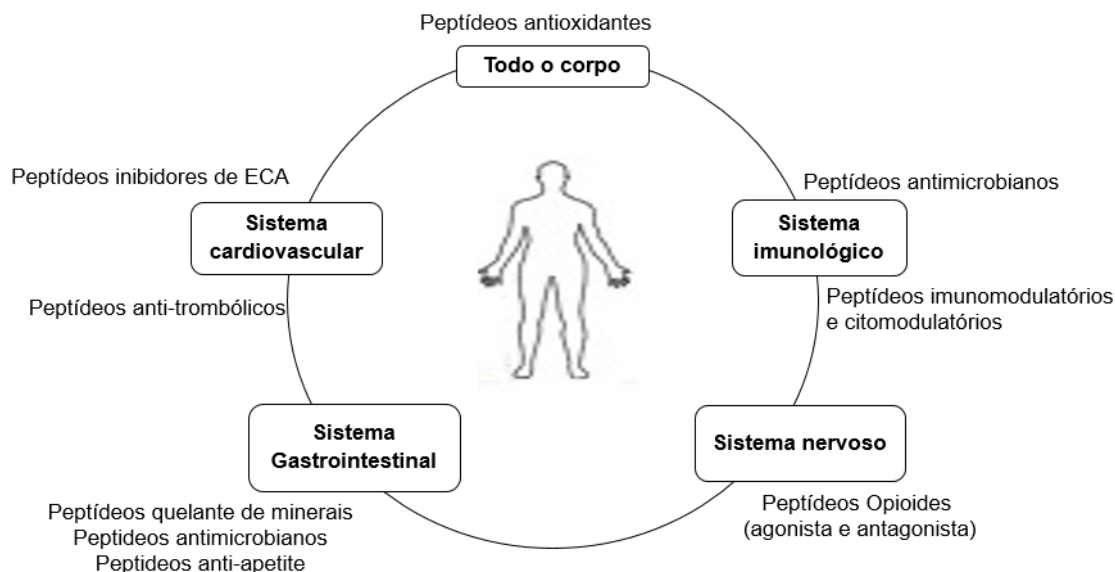
Figura 2. Uso da hidrólise enzimática para liberação das frações da caseína e de peptídeos bioativos.



Fonte: Adaptado de Ranadheera et al. (2016).

Esta funcionalidade presentes nos peptídeos bioativos está diretamente relacionada ao fato desses pequenos fragmentos proteicos serem derivados das caseínas (α_{s1} , α_{s2} , β e κ - caseína) e proteínas do soro (incluindo α -lactalbumina, β -lactoglobulina e lactoferrina). Estes peptídeos apresentam uma gama de atividades biológicas (Figura 3), incluindo inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA), antimicrobianos, antifúngicos, antiviral, inibição de dipeptidil peptidase IV (DPP-IV), fatores antagonistas e agonistas opioide, imunomodulação, quelação mineral e funções antioxidativas (NIELSEN et al., 2017).

Figura 3. Funções fisiológicas dos peptídeos bioativos derivados de leite.



Fonte: Adaptado de Giacometti; Buretic-Tomljanovic (2017).

As proteínas lácteas são extraordinárias fontes de sequência de peptídeos com potencial para as diversas atividades biológicas (PARK et al. 2009). Já são comercializados produtos contendo sequências peptídicas que atuam como anticancerígeno, anti-hipertensivos, que agem na ligação mineral, no aumento da saciedade e no alívio de sintomas do estresse (KORHONEN, 2009). Agyei et al. (2016) recomendam que peptídeos de origem alimentar sejam redirecionados para empregar como produtos comestíveis, na composição de bebidas lácteas ou suco de frutas.

2.2.1. Peptídeos antioxidantes

Os processos metabólicos do organismo sintetizam diversos radicais livres e algumas espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN), o que ocasiona uma sobrecarga no sistema de defesa à oxidação enzimática ou não enzimática, implicando na ocorrência ou iniciação de diversas patologias crônicas associadas, doenças cardiovasculares, neoplasias, diabetes mellitus, doenças oculares e distúrbios neurodegenerativos, ou na progressão das mesmas (KETNAWA et al., 2016; HARNEDY; O'KEEFFE; FITZGERALD, 2017).

Esse estresse oxidativo decorrente das ERO e ERN advém tanto do ambiente endógeno quanto do exógeno, podendo atuar em macromoléculas importantes, como o DNA, o RNA e outras moléculas como as proteínas e os lipídeos (oxidação lipídica em alimentos). Todavia, os impactos nos ácidos nucléicos apresentam maior importância biológica, uma vez que podem gerar desordem nas bases nitrogenadas e conseqüente mutação gênica (BARREIROS; DAVID, 2006; ZHANG et al., 2010; ZHUANG et al., 2013; KETNAWA et al., 2016). Além disso, há algumas reações danosas associadas não apenas ao acúmulo dos radicais livres (ERO e ERN), bem como a oxidação lipídica acarretando na degradação alimentícia, o que gera grande impacto econômico (BARREIROS et al., 2006; LOBO et al., 2010).

Em decorrência do aumento da prevalência de diversas fisiopatologias associadas ao sistema de defesa, ao estresse oxidativo e as crescentes evidências existentes entre o uso de antioxidantes sintéticos comerciais e a ocorrência de efeitos negativos no organismo (HARNEDY; O'KEEFFE; FITZGERALD, 2017), há uma crescente necessidade de pesquisa e desenvolvimento de antioxidantes naturais que visem formar alternativas para a conservação de alimentos e que em contra partida diminuam não apenas o risco desenvolvimento dessas patologias associadas, mas que atuem como agentes alternativos para a conservação de alimentos (LOBO et al., 2010; SARMADI; ISMAIL, 2010).

Uma alternativa pode ser obtida a partir da clivagem da caseína que é capaz de liberar peptídeos que apresentam mecanismos antioxidantes dos peptídeos incluindo diversas capacidades de eliminação de radicais livres, devido a sua capacidade de doar elétrons de hidrogênio extinguindo esses radicais, inibição da peroxidação lipolítica, quelação de metais, sobretudo, ferro e cobre, ou a presença de multifuncionalidade (JRAD et al., 2014) que desempenham papel fundamental no mecanismo de controle da deterioração alimentar.

A capacidade antioxidante dos hidrolisados derivados das proteínas do leite está intrinsecamente relacionada as seqüências de aminoácidos,

características dos peptídeos, especificidade enzimática (PIHLANTO, 2006; DUARTE NETO et al., 2015).

Os peptídeos bioativos antioxidantes atuam na inibição das reações oxidativas levando a proteção da célula contra a ação destrutiva dos radicais livres (ERO e ERN), bem como no aumento da vida de prateleira de produtos alimentícios devido a inibição da peroxidação lipídica e de algumas reações que levam a deterioração de alimentos (SHANMUGAM et al., 2015; ZAMBROWICZ et al., 2015).

Para Power et al. (2013) e Toldrá et al. (2017), em virtude dessas habilidades apresentadas pelos peptídeos bioativos obtidos a partir da hidrólise enzimática, estes podem desempenhar papel importantíssimo no controle do estresse oxidativo provocado pelos radicais livres que são responsáveis por diversas doenças. Sendo assim, pesquisas vem sendo realizadas para o desenvolvimento de novos peptídeos oriundos de proteínas alimentares, sobretudo derivados da caseína do leite de diferentes espécies.

O potencial antioxidante pode ser avaliado considerando a eliminação de radicais como o radical hidroxila (ZHU et al., 2006), superóxido (BAMBAD et al., 2017), superóxido eliminação do radical DPPH (DUAN et al., 2016) e ABTS (HERNANDEZ-LEDESMA et al., 2005), bem como a quelação de íons metálicos como cobre, zinco ferro e cálcio (SAIGA et al., 2005; SÁNCHEZ-VIOQUE et al., 2012), por exemplo.

Na última década diversos peptídeos antioxidantes derivados da caseína do leite e da proteína do soro de diversas espécies tem sido identificados. Rival et al. (2001) e Gómez-Ruiz (2008) obtiveram peptídeos antioxidantes a partir da hidrólise da caseína bovina e ovina às enzimas gastrointestinais, respectivamente. Kumar et al. (2016) obteram peptídeos antioxidantes a partir do caseinato de camelo submetido hidrólise enzimática e ao fracionamento através de ultrafiltração.

Os exemplos de estudos, anteriormente citados, vem sendo desenvolvidos em relação ao potencial antioxidante de hidrolisados derivados da caseína do leite, entretanto, Harnedy, O'Keeffe e FitzGerald (2017) discutiram a necessidade de mais estudos em relação a capacidade antioxidante de

hidrolisados obtidos a partir da caseína do leite de búfala, uma vez que os trabalhos se limitam apenas ao estudo da proteína do soro. Outra questão levantada por Shunmugam et al. (2015) diz respeito a identificação e o sequenciamento desses peptídeos, sobretudo em relação a composição aminoacídica.

2.2.2. Peptídeos antidiabéticos

Diabetes pode ser descrita como um grupo heterogêneo de distúrbios (Quadro 1) caracterizada por transtornos associados ao metabolismo das macromoléculas (carboidratos, gorduras e proteínas) e hiperglicemia, associados as deficiências absolutas ou relativas em relação a produção da insulina (diabetes tipo 1) e/ou secreção e utilização deste hormônio (diabetes tipo 2). Existe também um terceiro tipo, diabetes mellitus gestacional, desenvolvida normalmente durante a gravidez, cessando após a mesma (BRADLEY, 1998; RAFFEL; GOODARZI, 2013; PIZZORNO, MURRAY; JOINER-BEY, 2016).

Atualmente, entre os distúrbios metabólicos que acometem a saúde humana a diabetes tem sido uma das principais preocupações ao lado de doenças degenerativas e cardiovasculares. De acordo com a OMS, cerca de 3% da população mundial (aproximadamente 370 milhões de pessoas) é acometida por essa patologia e estima-se que a prevalência dobre até o ano de 2025 (JAN; KUMAR; JAH, 2016).

A diabetes mellitus é um conjunto de distúrbios metabólicos que acomete o sistema endócrino podendo gerar danos e diversas complicações graves, incluindo danos aos órgãos, como insuficiência renal, bem como a existência de correlação entre a resistência à insulina também está relacionada à hipertensão (MATSUI et al., 1996). O tratamento mais eficaz para diabetes é a manutenção dos níveis de glicose sanguínea em parâmetros adequados (LACROIX; LI-CHAN, 2012; YU et al., 2012), para isso, recorre-se ao uso de inibidores da α -glicosidase, enzima que cliva oligossacarídeos e dissacarídeos em D-glicose, e ao emprego de inibidores da dipeptidil peptidase-4 (DPP-4) que é responsável pela degradação do hormônio GLP1, a qual apresenta como função o aumento

na secreção de insulina e diminuição da secreção de glucagon pós-refeição (ZAMBROWICZ et al., 2015).

Quadro 1. Diferença entre diabetes tipo 1 (T1DM) e tipo 2 (T2DM).

Característica	Tipo 1	Tipo 2
Idade	Geralmente acomete menores de 40 anos	Normalmente maiores de 40
Proporção entre os diabéticos	<10%	>90%
Histórico familiar	Incomum	Comum
Aparecimento de sintomas	Rápido	Lento
Obesidade inicial	Incomum	Comum
Níveis de insulina	Diminui	Normalmente é alto inicialmente diminuindo após vários anos
Resistência a insulina	Ocasional	Frequente
Tratamento com insulina	Sempre	Normalmente não é necessário.

Adaptado de Pizzorno, Murray e Joiner-bey, 2016

Há evidências que sugerem que diabetes mellitus, principalmente a tipo 2, seja uma fisiopatologia associada a doenças cardiovasculares e ao estresse oxidativo, bem como uma relação direta destas com patologias relacionadas a alimentação, como a obesidade, representando problemas de saúde mundial (BRANDELLI; DAROIT; CORRÊA, 2015).

O tratamento de diabetes mellitus e de outras fisiopatologias associadas ao uso de medicamentos, com o mínimo ou nenhum efeito colateral, é um dos principais desafios para a medicina atual (PIZZORNO, MURRAY; JOINER-BEY, 2016). Nesse sentido, o emprego de medidas corretivas e preventivas naturais tem despertado o interesse de diversos pesquisadores, sobretudo, o uso de peptídeos bioativos de origem alimentar (JAN; KUMAR; JAH, 2016).

Sendo assim, segundo Zambrowicz et al. (2015) a correlação existente entre o comportamento de várias doenças acarreta na indicação de peptídeos bioativos com múltiplas funções, entre as quais potencial antioxidante, inibidor da enzima conversora de angiotensina e antidiabética. Enquanto que para Jan, Kumar e Jah (2016) a combinação peptídica com essas propriedades seria eficaz no controle e prevenção de doenças relacionadas a dieta, sobretudo a diabetes mellitus e as fisiopatologias associadas.

Diversos estudos que avaliam o potencial antidiabético de hidrolisados proteicos derivados da proteína do leite são realizados. Jan, Kumar e Jhan (2016) observaram potencial antidiabéticos em peptídeos oriundos da hidrólise do caseinato ovino submetido ao tratamento com diferentes proteases e o efeito da fervura sobre a mesma. Konrad et al. (2014) analisaram a inibição de α -glicosidase de *Saccharomyces cerevisiae* por frações dos hidrolisados derivados do caseinato bovino empregando uma protease vegetal. Lacroix e Li-Chan (2013) verificaram que hidrolisados proteicos derivados da hidrólise de frações proteicas do soro de leite inibiram a α -glicosidase intestinal de mamíferos.

Assim sendo, existe uma importância na exploração de componentes alimentares, dentre os quais os hidrolisados proteicos que apresentem potencial atividade inibitória das enzimas responsáveis pelo aumento glicêmico no sangue, bem como os parâmetros fisiológicos relacionados como alternativas potenciais de nutracêuticos (URAIPONG; ZHAO, 2015).

2.2.3. Peptídeos anti-hipertensivos

As doenças cardiovasculares, a principal causa de morte no mundo, tem a hipertensão como um dos principais fatores de riscos para o seu desenvolvimento (GALLEGO et al., 2018). A hipertensão é caracterizada pela prolongada elevação da pressão sanguínea que pode ser melhorada por hábitos alimentares saudáveis e a prática de exercícios físicos, assim como pelo uso de medicamentos, que em sua maioria, apresentam preço elevado e inúmeros efeitos colaterais (LENNON et al., 2017). Existe um crescente aumento no desenvolvimento de pesquisas na busca de compostos naturais de origem alimentar, sobretudo láctea que exercem efeito benéfico sobre o sistema cardiovascular.

Os peptídeos bioativos provenientes da hidrólise de componentes alimentícios, principalmente derivado da caseína, têm sido amplamente investigados como medida preventiva ou tratamento de doenças cardiovasculares, sobretudo hipertensão (GALLEGO et al., 2018).

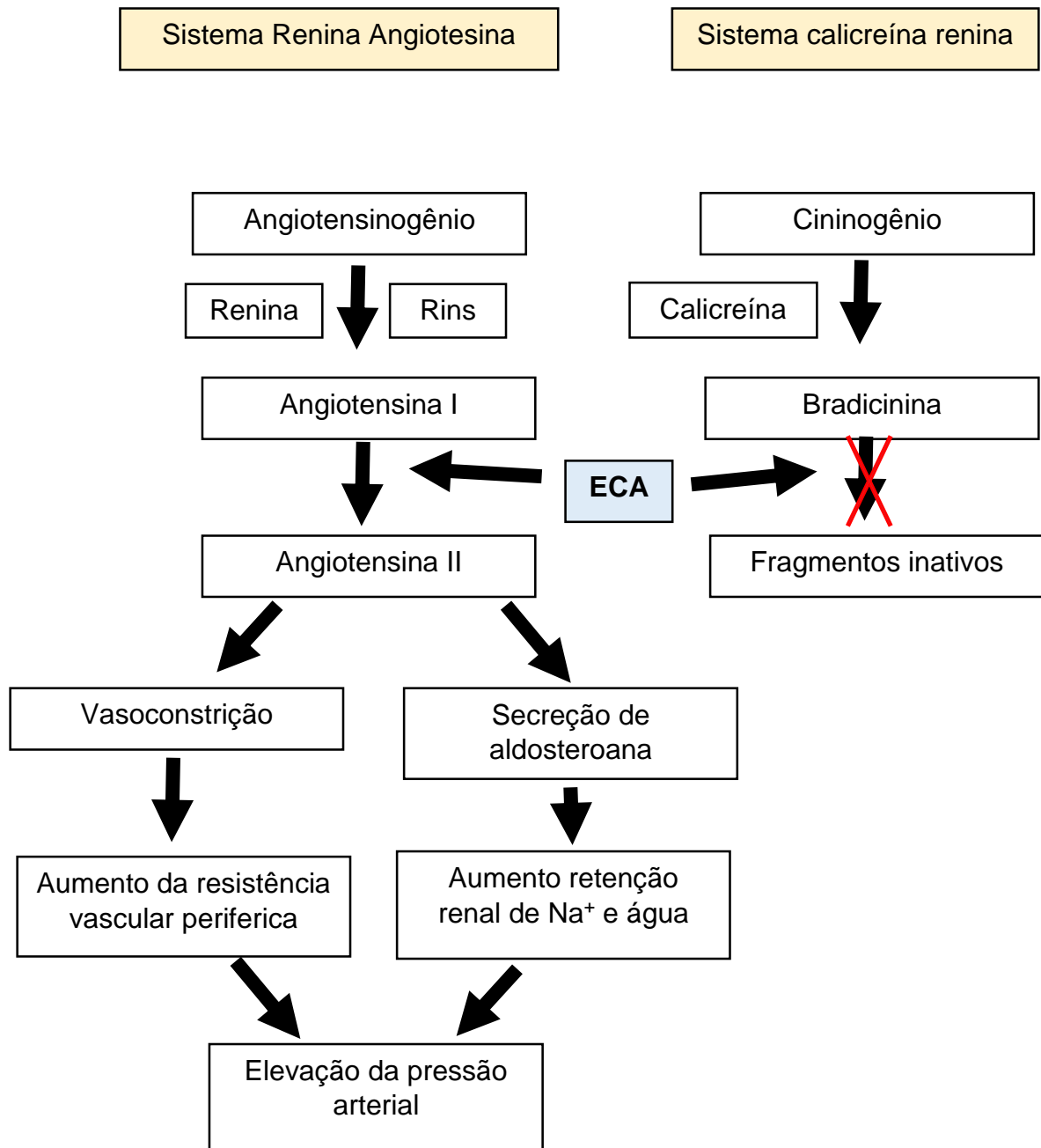
O interesse pela busca de peptídeos bioativos capazes de inibir a ação da enzima conversora de angiotensina I, um dos principais mecanismos de ação dos anti-hipertensivos, deriva da necessidade de encontrar fontes naturais derivados de alimentos que possam ser utilizados contra a hipertensão apresentando baixo custo e o mínimo de efeitos colaterais (SALEH, ZHANG, SHEN, 2016; BHAT; KUMAR; BHAT, 2017).

O mecanismo de ação dos anti-hipertensivos mais estudado é a inibição da enzima conversora de angiotensina pelo sistema renina-angiotensina (Figura 4). O sistema renina-angiotensina desempenha papel importante no controle da pressão arterial e no equilíbrio dos eletrólitos corporais.

O sistema renina-angiotensina tem seu início na clivagem do angiotensinogênio pela renina produzindo angiotensina I; esta é clivada pela enzima conversora de angiotensina em angiotensina II, um potente vasoconstritor que tem ação mediada pela ligação com receptores de endotelina-1 e endotelina-2. A endotelina-1 induz a vasoconstrição acarretando no aumento no nível de Ca^{2+} nas células musculares vasculares, leva a liberação da aldosterona que aumenta a retenção de sal e água e conseqüente inibição da renina, aumento de processos inflamatórios e estresse oxidativo. Já a ligação com o receptor de endotelina-2 produz vasodilatação através do sistema do óxido nítrico, acarretando na proteção contra a hipertensão (UDENIGWE; MOHAN, 2014; WU et al., 2017).

Outra via consiste na capacidade que a enzima conversora de angiotensina apresenta em hidrolisar a bradicinina, vasodilatador, em fragmentos inativos, o que acarreta na inibição indireta da produção do óxido nítrico que ocorre durante a regulação da pressão arterial quando a bradicinina se liga a seus receptores (SILTARI; KORPELA; VAPAATALO, 2016; WU et al, 2017).

Figura 4. Função da enzima conversora da angiotensina I (ECA) no sistema renina angiotensina, participação no sistema caliceína-renina e atuação dos peptídeos bioativos sobre a ECA.



Fonte: Adaptada de GALLEGO et al., 2018

Os mecanismos envolvidos no controle da pressão arterial empregando peptídeos derivados da hidrólise enzimática de alimentos baseia-se na redução da geração da angiotensina II, assim como na inativação da bradicinina acarretando na diminuição da pressão arterial, entretanto outras vias metabólicas também podem ser empregadas (SALEH; ZHANG; SHEN, 2016; PIHLANTO; MÄKINEN, 2017; UDENIGWE; MOHAN, 2017).

Meisel (2004) ao correlacionar atividade inibitória de enzima conversora de angiotensina (ECA) e a estrutura peptídica demonstram que a ECA prefere substratos com resíduos de aminoácidos hidrofóbicos. Esperjo-carpio et al (2013) obtiveram entre 30 e 65% de inibição da enzima conversora de angiotensina ao submeter a caseína e as proteínas do soro de leite de cabra a ação individual e simultânea das enzimas subtilina e tripsina. Luo et al (2014) que ao hidrolisar a caseína pela ação proteolítica de três enzimas obtiveram inibição de ECA máxima de 65%, sendo comparáveis à atividade anti-hipertensiva encontrada em hidrolisados derivados da caseína (MIGUEL et al., 2004) e do ovo obtidos por meio de hidrólise enzimática (MUGUERZA et al., 2006) ou por fermentação (CONTRERAS et al., 2009).

2.2.4. Peptídeos antimicrobianos

O uso incorreto e indiscriminado de antibiótico tem feito com que diversas cepas de micro-organismos adquiram resistência à antibioticoterapia convencional, nesse contexto, a busca por novas substâncias antibióticas parece ser essencial (KAMYSZ, 2005; PARK et al., 2011). Dentre essas novas fontes, destacam-se os peptídeos de origem alimentar, sobretudo derivados da caseína láctea.

Jones e Simms reconheceram em 1930 a atividade antibacteriana do leite ao relatar que o leite tinha potencial antimicrobiano *in vitro* contra *Streptococcus* sp.. Além disso, as fontes peptídicas naturais têm recebido maior atenção na última década (McCANN, 2006), sobretudo devido a resistência antimicrobiana adquirida pelo uso indiscriminado de antibióticos. Os peptídeos de origem láctea apresentam os mais diversos mecanismos de ação devido às suas características estruturais (CLARE et al. 2003).

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) agem ligando-se às membranas das células bacterianas causando a modificação da bicamada lipídica. Além disso, a maioria dos PAMs apresentam uma região hidrofílica e outra hidrofóbica conferindo-lhes a capacidade de ligar-se tanto aos componentes lipídicos quanto aos grupos de fosfolípídios das bactérias, modificando a seletividade da membrana (BAHAR; REN, 2013). Essa capacidade de ligar-se aos diferentes componentes na membrana plasmática bacteriana confere aos peptídeos a capacidade de ligar-se tanto a bactérias gram-positivas quanto a bactérias gram-negativas.

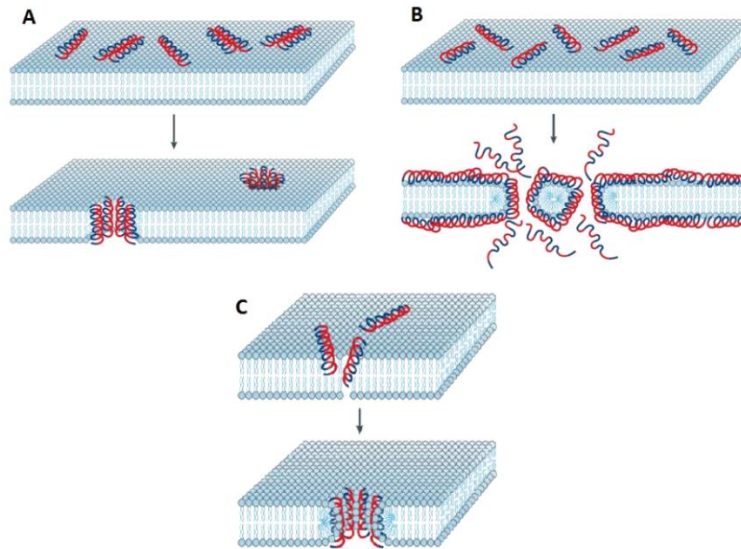
Diversos modelos são empregados para explicar os mecanismos de indução à morte celular por peptídeos antimicrobianos, dentre eles, destacam-se o Modelo *barrel stave* (Figura 5A), Modelo *carpet* (Figura 5B) e Modelo *toroidal* (Figura 5C).

De acordo com Nascimento et al. (2003) e Brogden (2005) os modelos *barrel stave* e *toroidal* levam à morte celular por extravasamento do conteúdo interno da célula, cujas diferenças estão relacionadas ao modo de agregação entre os peptídeos e membrana plasmática das bactérias. Já no modelo *carpet* cujo mecanismo de ação é semelhante a um detergente, acarreta na perturbação da bicamada lipídica devido a desagregação da membrana.

Peptídeos antibacterianos derivados de caseína de diversas espécies já foram criptografados na proteína original, estes peptídeos provavelmente são derivados da fração α_1 e κ - caseína, que apresentam atividade antimicrobiana contra diversos generos bacterianos (BENKERROUM, 2010).

A capacidade de diminuição ou inibição do crescimento microbiano se deve a variação composicional de aminoácidos, as características estruturais e físico-químicas dos peptídeos, o que torna os mecanismos de ação difíceis de serem previstos e neutralizados pela defesa microbiana o que facilita a atuação dos PAM's sobre os diversos gêneros bacterianos (AKALIN, 2014).

Figura 5. Modelos dos mecanismos de indução a morte celular por peptídeos antibacterianos. Modelo *barrel stave* (A); Modelo *carpet* (B); e Modelo *toroidal* (C). Regiões hidrofóbicas dos peptídeos estão coloridas em azul e as hidrolíticas, coloridas em vermelho.



Fonte: Adaptada de Brogden (2005).

Devido a essa característica antimicrobiana, os hidrolisados proteicos de origem láctea podem ser utilizados como ingredientes em alimentos funcionais, nutracêuticos e farmacêuticos para controlar e prevenir doenças (AKALIN, 2014).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial biológico de hidrolisados e frações de peptídeos provenientes de caseinatos de *Bos tauros*, *Capra aegagrus* e *Bubalus bubalis* por diferentes proteases comerciais.

3.2 Objetivos específicos

- Extrair a caseína de leite bovino, caprino e bubalino;
- Hidrolisar caseinatos pela ação de papaína, bromelina, neutrase e tripsina;
- Avaliar a capacidade antioxidante em relação a eliminação dos radicais ABTS, DPPH, hidroxila, superóxido, quelação de ferro e cobre dos hidrolisados das diferentes espécies;
- Selecionar a melhor espécie e o melhor tempo em relação a capacidade antioxidante dos hidrolisados e o grau de hidrólise;
- Hidrolisar o caseinato da melhor espécie em condições adequadas de hidrólise de acordo com o melhor tempo;
- Avaliar a capacidade antioxidante, antidiabética, anti-hipertensiva e antibacteriana das frações e do hidrolisado da espécie e tempo selecionados.

4. REFERÊNCIAS

AGYEI, D. et al. Bioprocess challenges to the isolation and purification of bioactive peptides. **Food and Bioproducts Processing**, v. 98, p. 244-256, 2016.

AKALIN, A. S. Dairy-derived antimicrobial peptides: Action mechanisms, pharmaceutical uses and production proposals. **Trends in Food Science & Technology**, v. 36, n. 2, p. 79-95, 2014.

ATAMER, Z. et al. β -casein: isolation, property and functionality. A review. **International Dairy Journal**, v. 66, p. 115-125, 2017.

BAHAR, A. A.; REN, D. Antimicrobial peptides. **Pharmaceuticals**, v. 6, n. 12, p. 1543-1575, 2013.

BALTI, R. et al. Nine novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from cuttlefish (*Sepia officinalis*) muscle protein hydrolysates and antihypertensive effect of the potent active peptide in spontaneously hypertensive rats. **Food Chemistry**, v. 170, p. 519 -525, 2015.

BAMDAD, F. et al. Anti-Inflammatory and antioxidant properties of casein hydrolysate produced using high hydrostatic pressure combined with proteolytic enzymes. **Molecules**, v. 22, n. 4, p. 609, 2017.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M. Oxidative Stress: Relations between the formation of reactive species and the organism's defense. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123. 2006.

BELICIU, C. M.; MORARU, C. I. Physico-chemical changes in heat treated micellar casein e Soy protein mixtures. **Food Science and Technology**, v. 54, p. 469-476, 2013.

BELICIU, C. M.; MORARU, C. I. Physico-chemical changes in heat treated micellar casein e Soy protein mixtures. **Food Science and Technology**, v. 54, p. 469-476, 2013.

BENKERROUM, N. Antimicrobial peptides generated from milk proteins: a survey and prospects for application in the food industry. **A review International Journal of Dairy Technology**, v.63, p. 320-338, 2010.

BHAT, Z.F.; KUMAR, S.; BHAT, H.F. Antihypertensive peptides of animalorigin: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.57, p.566-558, 2017.

BHAT, Z.F.; KUMAR, S.; BHAT, H.F. Antihypertensive peptides of animalorigin: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.57, p.566-558, 2017.

BRADLEY et al. **Comprehensive Clinical Psychology**. Elsevier, 1998.

BRANDELLI, A.; DAROIT, D. J.; CORRÊA, A. P. F. Whey as a source of peptides with remarkable biological activities. **Food Research International**, v. 73, p. 149-161, 2015.

BRASIL. Ministério Da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária (DISPOA). Instrução Normativa n062, de 26 de agosto

de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. **Diário Oficial da União**, Brasília, 26 de agosto de 2003. Seção 1.

BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 238-250, 2005.

BROYARD, Camille; GAUCHERON, Frédéric. Modifications of structures and functions of caseins: a scientific and technological challenge. **Dairy Science & Technology**, v. 95, n. 6, p. 831-862, 2015.

CARDOSO, R. B. et al. Produção e composição química do leite de vacas em lactação mantidas a pasto submetidas à diferentes sistemas alimentares. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.18, n.1, p.113-126, 2017.

CARRASCO-CASTILLA, J. et al. Antioxidant and metal chelating activities of peptide fractions from phaseolin and bean protein hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 135, p. 1789–1795, 2012.

CHANG, O. K. et al. S. Casein hydrolysis by *Bifidobacterium longum* KACC91563 and antioxidant activities of peptides derived therefrom. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 5544-5555, 2013.

CLARE, D.A.; CATIGNANI, G.L.; SWAISGOOD, H.E. Biodefense properties of milk: the role of antimicrobial proteins and peptides. **Current Pharmaceutical Design**, v.9 p.1239-1255, 2003

CONNOLLY, A.; PIGGOTT, C. O.; FITZGERALD, R. J. In vitro α -glucosidase, angiotensin converting enzyme and dipeptidyl peptidase-IV inhibitory properties of brewers' spent grain protein hydrolysates. **Food Research International**, v. 56, p. 100-107, 2014.

DUAN, X. et al. Evaluation of antioxidant property of extract and fractions obtained from a red alga, *Polysiphonia urceolata*. **Food Chemistry**, v. 95, n. 1, p. 37-43, 2006.

DUARTE NETO, J.M.W. et al. Production of antioxidant hydrolysate from bovine casein using immobilized *Penicillium aurantiogriseum* protease on magnetic nanoparticles. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 3149-3155, 2015.

FERREIRA, J. F.; SANTANA, J. C. C.; TAMBOURGI, E. B. The effect of pH on bromelain partition from *Ananas comosus* by PEG4000/phosphate ATPS. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, n. 1, p. 125-132, 2011.

FREITAS, A. C. et al. Antioxidative peptides: Trends and perspectives for future research. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 36, p. 4575-4594, 2013.

GALLEGO, M.; MORA, L.; TOLDRÁ, F. Health relevance of antihypertensive peptides in foods. **Current Opinion in Food Science**, v.9, p. 8-14, 2018.

GIACOMETTI, J.; BURETIĆ-TOMLJANOVIĆ, A. Peptidomics as a tool for characterizing bioactive milk peptides. **Food chemistry**, v. 230, p. 91-98, 2017.

GIL-CHÁVEZ, G. et al. Technologies for extraction and production of bioactive compounds to be used as nutraceuticals and food ingredients: an overview. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, n. 1, p. 5-23, 2013.

GÓMEZ-RUIZ, J. A. et al. Antioxidant activity of ovine casein hydrolysates: identification of active peptides by HPLC–MS/MS. **European Food Research and Technology**, v. 227, n. 4, p. 1061-1067, 2008.

GÓMEZ-RUIZ, J. Á.; RAMOS, M.; RECIO, I. Angiotensin converting enzyme inhibitory activity of peptides isolated from Manchego cheese: Stability under simulated gastrointestinal digestion. **International Dairy Journal**, v. 14, n. 12, p. 1075-1080, 2004.

GU, M. et al. Identification of antioxidant peptides released from defatted walnut (*Juglans sigillata* Dode) meal proteins with pancreatin. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, p. 213 -220, 2015.

HARNEDY, Pádraigín A.; O'KEEFFE, Martina B.; FITZGERALD, Richard J. Fractionation and identification of antioxidant peptides from an enzymatically hydrolysed *Palmaria palmata* protein isolate. **Food Research International**, v. 100, p. 416-422, 2017.

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; DÁVALOS, A.; BARTOLOMÉ, B.; Amigo, L. Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from α -lactalbumin and β -lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/ MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.588–593, 2005.

HERNÁNDEZ-LEDESMA, Blanca; DEL MAR CONTRERAS, María; RECIO, Isidra. Antihypertensive peptides: production, bioavailability and incorporation into foods. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 165, n. 1, p. 23-35, 2011.

HOLT, C. et al. Invited review: Caseins and the casein micelle: Their biological functions, structures, and behavior in food. **Journal of Theory Science**, v. 96, n. 10, p. 6127-6146, 2013.

HOLT, C. Structure and stability of bovine casein micelles. **Advances in Protein Chemistry**, v. 43, p. 63-151, 1992.

HORNE, D. S. Casein interactions: casting light on the black boxes, the structure in dairy products. **International Dairy Journal**, v. 8, n. 3, p. 171-177, 1998.

JABBARI, S.; HASANI, R.; KAFILZADEH, F.; JANFESHAN, S. 2012. Antimicrobial Peptides from Milk Proteins: **A Prospectus. Scholars Research Library**, v. 3, n.11, p. 5313 -5318.

JAN, F.; KUMAR, S.H.; RICHA, R.H.A.. Effect of boiling on the antidiabetic property of enzyme treated sheep milk casein. **Veterinary World**, v. 9, n. 10, p. 1152, 2016.

JRAD, Z. et al. Antioxidant activity of camel milk casein before and after in vitro simulated enzymatic digestion. **Mljekarstvo/Dairy**, v. 64, n. 4, p. 287-294, 2014.

KAMYSZ, W.; TURECKA, K. Antimicrobial preservative effectiveness of natural peptide antibiotics. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v. 62, p. 341-344, 2005.

KETNAWA, S. et al. Gelatin hydrolysates from farmed Giant catfish skin using alkaline proteases and its antioxidative function of simulated gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, v. 192, p. 34-42, 2016.

KONRAD, B. et al. The evaluation of dipeptidyl peptidase (DPP)-IV, α -glucosidase and angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory activities of whey proteins hydrolyzed with serine protease isolated from Asian pumpkin (*Cucurbita ficifolia*). **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 20, n. 4, p. 483-491, 2014.

KORHONEN, H. Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. **Journal of functional foods**, v. 1, n. 2, p. 177-187, 2009.

KUMAR, S. et al. Antioxidative effect of yak milk caseinates hydrolyzed with three different proteases. **Veterinary World**, v. 6, n. 10, 2013.

LACROIX, I.M.E.; LI-CHAN, E.C.Y. Evaluation of the potential of dietary proteins as precursors of dipeptidyl peptidase (DPP)-IV inhibitors by an in silico approach. **Journal of Functional Foods**, v. 4, n. 2, p. 403-422, 2012.

LACROIX, I.M.E.; LI-CHAN, E.C.Y. Inhibition of dipeptidyl peptidase (DPP)-IV and α -glucosidase activities by pepsin-treated whey proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 31, p. 7500-7506, 2013.

LENNON, S.L. et al. Evidence analysis library evidence-based nutrition practice guideline for the management of hypertension in adults. **Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics**, v. 117, p.1445-1458, 2017.

LIU, J. et al. Purification and identification of novel antioxidant peptides from egg white protein and their antioxidant activities. **Food Chemistry**, v. 175, p. 258-266, 2015.

LOBO, V. et al. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacognosy Reviews**, v. 4, n. 8, p. 118, 2010.

MARQUES, R.M. et al. Peptides from cowpea present antioxidant activity, inhibit cholesterol synthesis and its solubilisation into micelles. **Food Chemistry**, v.168, p.288-293, 2015.

MATSUI, T. et al. In vitro survey of α -glucosidase inhibitory food components. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 60, n. 12, p. 2019-2022, 1996.

MCCANN, K. B. et al. Isolation and characterisation of a novel antibacterial peptide from bovine α S1-casein. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 4, p. 316-323, 2006.

MCCARTHY, N. A. et al. Sensitivity of emulsions stabilised by bovine b-casein and lactoferrin to heat and CaCl_2 . **Food Hydrocolloids**, v. 35, p. 420-428, 2014.

NASCIMENTO, A. C. C. et al. Antimicrobial peptides from anurans skin secretions. *Protein and Peptides Letters*, v. 10, p. 227- 238, 2003

NIELSEN, S. D. et al. Milk bioactive peptide database: A comprehensive database of milk protein-derived bioactive peptides and novel visualization. *Food Chemistry*, v. 232, p. 673-682, 2017.

O'MAHONY, J. A.; FOX, P. F. Milk proteins: Introduction and historical aspects. In: **Advanced Dairy Chemistry**. Springer US, p. 43-85, 2013.

OLALLA, M. et al. Nitrogen fractions of Andalusian goat milk compared to similar types of commercial milk. *Food Chemistry*, v. 113, p.835-838, 2009.

PANDYA , A.J.; KHAN , M.M.H. 2006. **Buffalo Milk**. In: Handbook of Milk of Non – Bovine Mammals . YOUNG W. P.; GEORGE F.W. Haenlein (Eds) Ames, Iowa: Blackwell Publishing Professional. pp. 195 – 273.

PARK, S. C.; PARK, Y.; HAHM, K. S. The role of antimicrobial peptides in preventing multidrug-resistant bacterial infections and biofilm formation. *International of Molecular Sciences*, v. 12, p. 5971-5992, 2011.

PARK, Y. W. (Ed.). **Bioactive components in milk and dairy products**. John Wiley & Sons, 2009.

PIHLANTO, A. Antioxidative peptides derived from milk proteins. *International Dairy Journal*, v. 16, n. 11, p. 1306-1314, 2006.

PIHLANTO, A.; MÄKINEN, S. The function of renin and the role of food-derived peptides as direct renin inhibitors. In *Renin– angiotensin System — Past, Present and Future*. Edited by Tolekova AN. *InTech*, v. 2017, p.341-358, 2017.

PIZZORNO, J.E.; MURRAY, M.T.; JOINER-BEY, H. **The Clinician's Handbook of Natural Medicine**. 3 ed. Elsevier, 2016.

POWER, O.; JAKEMAN, P.; FITZGERALD, R. J. Antioxidative peptides: enzymatic production, in vitro and in vivo antioxidant activity and potential applications of milk-derived antioxidative peptides. *Amino Acids*, v. 44, n. 3, p. 797-820, 2013.

RAFFEL, L.J.; GOODARZI, O.M. **Principles and Practice of Medical Genetics**. Elsevier, 2013.

RAIKOS, V.; DASSIOS, T. Health-promoting properties of bioactive peptides derived from milk proteins in infant food: a review. *Dairy Science & Technology*, v. 94, n. 2, p. 91-101, 2014.

RAIKOS, V.; DASSIOS, T. Health-promoting properties of bioactive peptides derived from milk proteins in infant food: a review. *Dairy Science & Technology*, v. 94, n. 2, p. 91-101, 2014.

RANADHEERA, C. S. et al. Utilizing unique properties of caseins and the casein micelle for delivery of sensitive food ingredients and bioactives. *Trends in Food Science & Technology*, v. 57, p. 178-187, 2016.

RANADHEERA, C. S. et al. Utilizing unique properties of caseins and the casein micelle for delivery of sensitive food ingredients and bioactives. *Trends in Food Science & Technology*, v. 57, p. 178-187, 2016.

RIVAL, Sandrine G. et al. Caseins and casein hydrolysates. 1. Lipoxygenase inhibitory properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 1, p. 287-294, 2001.

RYAN, J. T. et al. Bioactive peptides from muscle sources: meat and fish. **Nutrients**, v. 3, n. 9, p. 765-791, 2011.

SAIGA, A. I.; TANABE, S.; NISHIMURA, T. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 12, p. 3661-3667, 2003.

SALEH, A.S.; ZHANG, Q.; SHEN, Q. Recent research in antihypertensive activity of food protein-derived hydrolyzates and peptides. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.56, p.760-787, 2016.

SÁNCHEZ-VIOQUE, R. et al. In vitro antioxidant and metal chelating properties of corm, tepal and leaf from saffron (*Crocus sativus* L.). **Industrial Crops and Products**, v. 39, p. 149-153, 2012.

SARMADI, B. H.; ISMAIL, A. Antioxidative peptides from food proteins: a review. **Peptides**, v. 31, n. 10, p. 1949-1956, 2010.

SGARBIERI, C. V. Review: Structural and physicochemical properties of milk proteins. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 8, p. 43-56, 2005.

SHANMUGAM, V. P. et al. Antioxidative peptide derived from enzymatic digestion of buffalo casein. **International Dairy Journal**, v. 42, p. 1-5, 2015

SHAZLY, A.B. et al. Fractionation and identification of novel antioxidant peptides from buffalo and bovine casein hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 232, p. 753-762, 2017.

SILTARI, A.; KORPELA, R.; VAPAATALO, H. Bradykinin-induced vasodilatation: Role of age, ACE1-inhibitory peptide, mas-and bradykinin receptors. **Peptides** 2016, v.85, p.46-55, 2016.

SINGH, B.P.; VIJ, S.; HATI, S.. Funtional significance of bioactive peptides derived from soybean. **Peptides**, v. 54, p. 171- 179, 2014

SLATTERY, Charles W. Casein micelle structure; an examination of models. **Journal of Dairy Science**, v. 59, n. 9, p. 1547-1556, 1976.

SLATTERY, Charles W.; EVARD, Rene. A model for the formation and structure of casein micelles from subunits of variable composition. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure**, v. 317, n. 2, p. 529-538, 1973.

STROOBANTS, K.; HO, P. H.; MOELANTS, E.; PROOST, P.; PARAC-VOGT, T. N. Selective hydrolysis of hen egg white lysozyme at Asp-X peptide bonds promoted by oxomolybdate. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 136, p. 73-80, 2014.

TOLDRÁ, Fidel et al. Generation of bioactive peptides during food processing. **Food Chemistry**, 2017.

UDENIGWE, C.C.; FOGLIANO, V. Food matrix interaction and bioavailability of bioactive peptides: two faces of the same coin? **Journal of Functional Foods**, v.35, p.9-12, 2017.

URAIPOONG, C.; ZHAO, J. Rice bran protein hydrolysates exhibit strong in vitro α -amylase, α -glucosidase and ACE-inhibition activities. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, p. 1101–1110, 2016.

WALSTRA, Pieter. Sobre a estabilidade das micelas de caseína¹. **Journal of Dairy Science**, v. 73, n. 8, p. 1965-1979, 1990.

WU, B. et al. Purification and identification of an angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from *Argopecten irradians* mantle enzymatic hydrolysate. **European Food Research and Technology**, v. 243: 711-717, 2017.

WU, S. et al. Simultaneous production of multi functional peptides by pancreatic hydrolysis of bovine casein in an enzymatic membrane reactor via combinational chromatography. **Food Chemistry**, v. 141, p.2944-2951, 2013.

YAMADA, A. et al. Novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from bovine casein. **Food Chemistry**, v. 141, p. 3781-3789, 2013.

YU, Z. et al. Novel peptides derived from egg white protein inhibiting α -glucosidase. **Food Chemistry**, v. 129, n. 4, p. 1376-1382, 2011.

YU, Z.; YIN, Y.; ZHAO, W.; LIU, J.; CHEN, F. Anti-diabetic activity peptides from albumin against α -glucosidase and α -amylase. **Food Chemistry**, v. 135, p. 2078- 2085, 2012.

ZAMBROWICZ, A. et al. Antioxidant and antidiabetic activities of peptides isolated from a hydrolysate of an egg-yolk protein by-product prepared with a proteinase from Asian pumpkin (*Cucurbita ficifolia*). **RSC Advances**, v. 5, n. 14, p. 10460-10467, 2015.

ZAMBROWICZ, Aleksandra et al. Multifunctional peptides derived from an egg yolk protein hydrolysate: isolation and characterization. **Amino acids**, v. 47, n. 2, p. 369-380, 2015.

ZHANG, L. et al. Inhibitory effect of raspberries on starch digestive enzyme and their antioxidant properties and phenolic composition. **Food Chemistry**, v. 119, n. 2, p. 592-599, 2010.

ZHU, K.X.; ZHOU, H.M.; QIAN, H.F. Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. **Process Biochemistry**. v.41, p.1296–1302, 2006

ZHUANG, H.; TANG, N.; YUAN, Y. Purification and identification of antioxidant peptides from corn gluten meal. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 4, p. 1810-1821, 2013.

CAPITULO 1

Prospecção e caracterização do potencial antioxidante de hidrolisados proteicos obtidos a partir a partir de caseinatos de diferentes espécies animais por meio de hidrólise enzimática

A ser submetido à revista:



TITULO: Prospecção e caracterização do potencial antioxidante de hidrolisados proteicos obtidos a partir de caseinatos de diferentes espécies animais por meio de hidrólise enzimática

Resumo:

Os componentes da proteína do leite são importantes precursores de peptídeos bioativos por apresentarem sequências aminoacídicas com diversas propriedades funcionais, fisiológicas, nutricionais e antimicrobianas que podem direcioná-las as indústrias alimentícias ou farmacêutica. Objetivou-se avaliar *in vitro* o potencial antioxidante de hidrolisados proteicos derivados dos caseinato bubalino, bovino e caprino submetidos a hidrólise empregando bromelina, papaína, tripsina e neutrase. Foi possível observar diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os caseinatos, apresentando grau de hidrólise mínimo de 2% (bovino) e máximo de 85% (bubalino). Em relação as atividades antioxidantes observaram-se comportamento distintos dos caseinatos frente aos diferentes tratamentos enzimáticos ao longo de 480 minutos. Os hidrolisados apresentaram potencial para o sequestro dos radicais hidroxila (entre 0 e 100%), superóxido (superior a 80%), ABTS (superior a 85%), DPPH (entre 20 e 95%) e quelar ferro (entre 10 e 100%) e cobre (entre 14 e 80%). As proteases empregadas na hidrólise dos caseinatos apresentaram potencial para obtenção de hidrolisados que apresentaram potente atividade antioxidante, o que acarreta em potencial aplicação alimentar, seja como alimento funcional, nutracêutico ou como aditivo alimentício natural.

Palavras-chave: Búfalo, espécies reativas de oxigênio, hidrólise, nutracêutico, peptídeos bioativos

1. Introdução

Os processos relacionados à oxidação podem originar diversos distúrbios patogênicos, levando a diversas doenças crônicas que estão correlacionada ao alto nível de estresse oxidativo. Tal fato acarreta em dano celular, devido ao desequilíbrio entre o sistema de defesa antioxidante e os radicais livres (BARBOSA et al., 2010). Estes, por sua vez, ao atacarem biomoléculas, proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos, levam a peroxidação lipídica e ao enfraquecimento do sistema de defesa antioxidante, sistema enzimático, o que aumenta o risco de ocorrência de diversas doenças em humanos (KEPEKCI et al., 2013).

Os componentes da proteína alimentar apresentam propriedades biológicas específicas tornando-os potenciais ingredientes na composição de alimentos promotores de saúde (SILVESTRE et al., 2013). Essa característica tem despertado o interesse nos derivados peptídicos da caseína do leite que se apresenta fisiológica e biologicamente ativos no organismo.

Os peptídeos derivados de proteínas lácteas possuem características que permitem que sejam uma fonte relevante de antioxidantes fisiológicos, dentre elas, apresentam anéis aromáticos, que são doadores de elétrons e têm caráter hidrofóbico apropriado (SILA; BOUGATEF, 2016; AGRAWAL; JOSHI; GUPTA, 2017). Esses componentes bioativos podem ser isolados e/ou administrados sob a forma de nutracêuticos garantindo aumento na quantidade dessas moléculas e sua absorção diretamente na circulação sanguínea, sendo direcionado para o local celular específico (McCLEMENTS et al., 2015).

Os peptídeos com atividades antioxidantes atreladas aos ensaios de eliminação dos radicais ABTS (2,2'- azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABDEL-HAMID et al., 2017), DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil), superóxido e hidroxila (WANG et al., 2015), quelação de ferro e cobre (BAMBAD et al., 2017) destacam-se entre as propriedades biológicas, fisiológicas e nutricionais. Essa funcionalidade permite o uso de peptídeos, sobretudo de origem alimentar, em uma série de aplicações, sobretudo, para o controle dos processos relacionados ao estresse oxidativo.

Com base nisso no presente estudo comparou-se a atividade antioxidante dos hidrolisados da caseína de origem bubalina, bovina e caprina através de ensaios de eliminação dos radicais ABTS (2,2'- azinobis-3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico), DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil), superóxido, hidroxila e quelação de ferro e cobre, que foram preparados através da hidrólise enzimática empregando bromelina, neutrase, papaína e tripsina.

2. Materiais e métodos

2.1. Obtenção da caseína do leite

Os caseinatos de sódio das espécies bovina (CBOV), bubalina (CBUB) e caprina (CCAP) foram obtidos empregando-se metodologia descrita por Egito et al. (2007), na qual o leite foi desnatado por centrifugação a 2100 x g por 30 minutos a 32 °C e logo depois precipitado em pH 4,6 com HCl 1 M e novamente centrifugado. Em seguida, o precipitado foi lavado em água destilada ajustando-se para pH 7 com NaOH 1 M. O ciclo precipitação / solubilização foi repetido até que as caseínas fossem solubilizadas pela última vez e dialisada contra água deionizada a 4 °C e, posteriormente, liofilizada.

2.2. Preparação dos hidrolisados de caseinato bovino, bulbalino e caprino empregando proteases comerciais

Os caseinatos foram hidrolisados empregando a metodologia descrita por Ruiz, Ramos e Recio (2004) com algumas modificações. Para a produção dos hidrolisados proteicos os caseinatos foram solubilizados em tampão fosfato de sódio 0,1 M com pH ajustado de acordo com a atividade ótima das enzimas. Para hidrólise enzimática empregou-se as seguintes enzimas comerciais: bromelina (E.C. 3.4.22.33, Sigma – Aldrich Chemical Co., St Louis, MO, EUA), a 60 °C e pH 6,5; papaína (E.C. 3.4.22.2, Sigma – Aldrich Chemical Co., St Louis, MO, EUA), a 50 °C e pH 6,5; tripsina (E.C. 3.4.21.4, Sigma – Aldrich Chemical Co., St Louis, MO, EUA), a 37 °C e pH 8,0 e neutrase (Novozymes, Dinamarca), a 50 °C e pH 7,5, com uma relação enzima:substrato 1:100 com coletas de alíquota nos tempos 0, 30, 60, 120, 240, 360 e 480 min. A reação hidrolítica foi interrompida por aquecimento a 100 °C por 10 minutos. Os hidrolisados foram armazenados e congelados a -6 °C até posterior utilização nas determinações analíticas.

2.3. Determinação do grau de hidrólise

O teor de aminoácidos foi determinado de acordo com a metodologia descrita por Benjakul e Morrissey (1997) modificada. Foram empregados 31,25 µL de cada hidrolisado, 0,5 mL de tampão fosfato (pH 8,2 0,3 M), em seguida adicionou-se 250 µL de solução de TNBS (ácido 2,4,6-trinitrobenzenossulfônico) a 0,01%. A mistura reacional foi incubada em banho maria a 50 °C por 30 minutos, posteriormente interrompida com a adição de 0,5 mL de sulfito de sódio (0,1 M), sendo mantida ao abrigo da luz por 15 minutos a temperatura ambiente (24 °C). A absorbância foi lida a 420 nm em espectrofotômetro *Biochrom Libra S22 UV/Vis* e os aminoácidos expressos em relação a L-leucina. O grau de hidrólise (GH) foi calculado de acordo com a equação:

$$GH = \left[\frac{A_t - A_0}{A_{\max} - A_0} \right] \times 100$$

Onde A_t é a quantidade de ligações peptídicas clivadas no tempo t . A_0 é a quantidade de aminoácido da proteína presente no substrato original. A_{\max} é a quantidade de aminoácidos presentes na proteína original obtidos após hidrólise ácida (HCl 6 M a 100 °C durante 24 h).

2.4. Determinação *in vitro* das atividades de eliminação de radicais livres dos hidrolisados

2.4.1. Atividade de eliminação do radical hidroxila

Os ensaios de eliminação do radical hidroxila foi determinado de acordo com a metodologia descrita por Zhu et al. (2006), modificada. Foram misturados 30µL da amostra contendo os diferentes hidrolisados, 50 µL de 1,10-fenantrolina (5 mM), 50 µL de FeSO₄ (5 mM), 50 µL de EDTA (15 mM) e 30 µL de tampão fosfato de sódio (0,2 M, pH 7,4) em microplacas de 96 poços de poliestireno (Corning®, Tewksbury, MA). Após 5 minutos, 60 µL de H₂O₂ foi adicionado para iniciar a reação de eliminação. A mistura reacional foi incubada por 1 h a 37 °C, a absorbância foi mensurada a 340 nm empregando leitor de microplaca Asys UVM 340 (Biochrom, Cambridge, Reino Unido). A atividade de eliminação do radical hidroxila foi calculado de acordo com a equação:

$$AERH (\%) = \left(\frac{A_{\text{Amostra}} - A_{\text{Degradada}}}{A_{\text{Não Degradada}} - A_{\text{Degradada}}} \right) * 100$$

Onde, os grupos degradados contêm todos dos reagentes envolvidos na reação, exceto pelo uso de água substituindo a amostra. O grupo não-degradado corresponde as soluções da amostra do grupo degradado exceto pelo uso de água substituindo o H₂O₂.

2.4.2. Atividade de eliminação do radical superóxido

A atividade de eliminação do radical superóxido (RS) foi determinada de acordo com o método descrito por MARKLUND e MARLUND, 1974 e BAMBAD et al., 2017 com modificações, 80 µL das amostras hidrolisadas foram misturadas a 80 µL de tampão Tris-HCl-EDTA 50 mM (1mM, pH 8,2). A mistura reacional foi incubada a 25 °C por 10 minutos. Posteriormente, adicionou-se 40 µL de solução de pirogalol 1,5 mM, empregou-se tampão Tris-HCl-EDTA como controle. A absorbância foi determinada a 340 nm por 5 minutos. A capacidade de eliminação do radical superóxido foi quantificada de acordo com a equação:

$$RS (\%) = [(\Delta A_{Controle}/min - \Delta A_{Amostra}/min)/(\Delta A_{Controle}/min)] * 100$$

Na qual, $A_{controle}/min$ representa a absorbância por minuto da solução controle contendo pirogalol e tampão, e $A_{amostra}/min$ representa a absorbância por minuto da amostra.

2.4.3. Ensaio de antioxidante para atividade de eliminação do radical DPPH

O efeito de eliminação das amostras frente ao radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil) foi determinado de acordo com a metodologia previamente descrita por Yen e Chen (1995), modificada por Duan et al. (2006). A mistura reacional consistiu em 200 µL da amostra contendo os hidrolisados e 200 µL de solução etanólica de DPPH 0,16 mM. A reação foi incubada por 30 min no escuro, e a absorbância mensurada a 517 nm. A habilidade de eliminação do radical DPPH foi calculado usando a equação:

$$DPPH (\%) = \left[1 - \left(\frac{A_{amostra} - A_{amostra\ branco}}{A_{Controle}} \right) \right] * 100$$

Onde, o $A_{amostra}$ é a absorbância das amostras, $A_{amostra\ branco}$ é a absorbância da amostra sem o DPPH e $A_{Controle}$ é a absorbância do controle (solução de DPPH sem amostra).

2.4.4. Ensaio de antioxidante para atividade de eliminação do radical ABTS

O ensaio de atividade antioxidante envolveu a eliminação do radical cátion $ABTS^{+\cdot}$, gerado a partir da oxidação de 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico (ABTS) 7 mM com persulfato de potássio 2,45 mM pré-incubados ao abrigo da luz por 12 horas antes da utilização. A solução $ABTS^{+\cdot}$ foi ajustada para absorvância de $0,700 \pm 0,02$ a 734 nm em espectrofotômetro, por diluição em tampão fosfato 5 mM, sendo realizado de acordo com metodologia descrita por Re et. al. (1999), modificada por Hernandez-Ledesma et al. (2005). Uma alíquota de 50 μ L da amostra foi misturada a 950 μ L da solução diluída de $ABTS^{+\cdot}$, a mistura reacional foi incubada por 10 minutos ao abrigo da luz, a temperatura ambiente (24 °C). A absorvância da reação foi mensurada a 734 nm e a atividade de eliminação do radical ABTS foi calculada de acordo com a equação:

$$ABTS (\%) = \left[\left(\frac{A_{Controle} - A_{amostra}}{A_{Controle}} \right) \right] * 100$$

Onde, $A_{amostra}$ é a absorvância das amostras, e $A_{Controle}$ é a absorvância do controle negativo empregando tampão fosfato.

2.4.5. Atividade quelante de Cu^{2+} e Fe^{2+}

A atividade quelante de ferro foi realizada de acordo com a metodologia descrita em Sánchez-Vioque et al. (2012) com modificações, empregando 125 μ L dos hidrolisados, misturados a 0,5 mL de tampão acetato de sódio (0,1 M e pH 4,9) e a 12,5 μ L de solução Fe^{2+} (2 mM). Após 30 minutos de incubação, foi adicionado 50 μ L de solução ferrozina (5mM), decorrido mais 30 minutos, e posteriormente, realizado leitura 562 nm (Carter, 1971).

A atividade quelante de cobre foi realizada de acordo com a metodologia descrita Saiga et al. (2003) com modificações, em que 0,5 mL de tampão acetato de sódio (pH 6,0, 50 mM) foi misturado a 12,5 μ L de solução de $CuSO_4$ (5mM) e 125 μ L do hidrolisado. Essa mistura foi incubada por 30 minutos e em seguida adicionado 12,5 μ L da solução de violeta de pirocatecol (4mM), após mais 30 minutos de incubação, a mistura foi lida a 632 nm em espectrofotômetro.

Para ambas as atividades o controle negativo foi realizado com água ao invés da amostra, o controle positivo foi realizado com solução de EDTA a 0,045%, a porcentagem de inibição foi determinada de acordo com a equação:

$$AQ (\%) = \left[\frac{(A_{\text{Controle}} - A_{\text{Amostra}})}{A_{\text{Controle}}} \right] * 100$$

2.5. Análise estatística

Os parâmetros foram analisados em triplicata e os dados expressos como média e coeficiente de variação. O delineamento experimental utilizado foi um esquema fatorial (4 x 3 x 7), totalizando 84 ensaios. Diferenças significativas entre os caseinatos submetidos a diferentes tratamentos enzimáticos e tempo de hidrólise foram obtidas empregando análise de variância unidirecional seguida de avaliação de diferenças entre as médias empregando-se o teste de comparação múltiplas de Scott-Knott no *S/ISVAR* versão 5.6 (DEX/UFLA, BRASIL).

3. Resultados e discussão

3.1 Grau de hidrólise

As enzimas bromelina, papaína, tripsina e neutrase apresentaram capacidade na clivagem dos caseinatos bovino (CBOV), bubalino (CBUB) e caprino (CCAP) no período de 480 minutos (tabela 1). O caseinato bubalino apresentou, de modo geral, os maiores valores de grau de hidrólise (GH%) em relação as demais espécies. De acordo com Cardoso et al. (2017) e Zhang et al. (2016) há uma grande homogeneidade entre os leites de búfala, cabra e vaca, diferindo em relação a cadeia proteica sobretudo na sequência aminoacídica presentes nas frações da caseína e no tamanho desta molécula.

Foi observado um aumento no comportamento do grau de hidrólise no decorrer do tempo (tabela 1) corroborando Sbroggio et al. (2016) afirma que se espera um aumento do GH% ao longo do tempo devido a liberação gradual de pequenos fragmentos de proteínas durante a catálise do caseinato.

Tabela 1. Grau de hidrólise (%) dos hidrolisados obtidos pela ação de bromelina, papaína, tripsina e neutrase sobre a caseína do leite bubalino, bovino e caprino após 480 minutos de hidrólise.

Caseinato	Tempo (minutos)							
	0	30	60	120	240	360	480	
BRO	CBUB	0,00Af	5,08Af	10,40Ae	25,69Ad	36,77Ac	64,84Ab	85,64Aa
	CBOV	0,00Ad	2,51Ad	12,38Ac	14,23Bc	25,58Bb	40,90Ba	45,96Ba
	CCAP	0,88Ad	6,24Ac	11,00Ac	27,61Ab	31,96Ab	40,61Ba	43,87Ba
CV 1 (%) = 12,98				CV 2 (%) = 17,48				
PAP	CBUB	0,00Ag	11,36Cf	35,86Be	43,65Ad	49,67Ac	57,46Ab	70,60Aa
	CBOV	3,39Ad	37,43Bc	38,30Bc	40,70Bc	46,80Aa	51,36Ba	51,60Ba
	CCAP	2,91Ac	45,23aB	42,28Cb	45,23Ab	49,26Aa	50,19Ba	51,28Ba
CV 1 (%) = 8,09				CV 2 (%) = 5,20				
TRI	CBUB	12,27Bd	57,24Ac	67,21Ab	68,23Ab	61,16Ac	67,12Ab	75,30Aa
	CBOV	1,56Be	36,04Bd	45,31Bd	57,71Bc	57,81Ab	58,65Ab	65,63Ba
	CCAP	1,08Ae	28,95Cd	30,38Cc	42,58Cb	53,35Ac	59,81Bb	73,68Aa
CV 1 (%) = 8,06				CV 2 (%) = 8,06				
NEU	CBUB	8,36Ac	57,11Ab	57,11Ab	53,74Ab	55,52Ab	59,61Ab	73,67Aa
	CBOV	1,19Ac	20,52Cb	22,85Cb	23,26Cb	20,67Cb	29,41Ba	34,54Ba
	CCAP	0,00Ac	33,45Bb	33,98Bb	32,39Bb	42,14Bb	62,42Aa	60,84Ca
CV 1 (%) = 13,22				CV 2 (%) = 14,17				

Os valores médios que carregam letras diferentes nas colunas (letras maiúsculas) e nas linhas (letras minúsculas) diferem significativamente ($p < 0,05$). Brom: bromelina; Pap: Papaína; Tri: Tripsina; Neu: neutrase. CBUB: Caseinato bubalino hidrolisado; CBOV: caseinato bovino hidrolisado; CCAP: caseinato caprino hidrolisado. CV 1 (%): Coeficiente de variação do caseinato; CV 2 (%): Coeficiente de variação do tempo de hidrólise.

Os maiores valores de GH% no tempo de 480 min. foram observados no tratamento com tripsina, principalmente para as espécies bovina (65,63%) e caprina (73,68%), diferindo estatisticamente entre si, enquanto que, a caseína bubalina apresentou maior GH% pela ação da bromelina (85,64%). Os menores valores médios de GH% foram observados para as espécies caprina e bubalina quando submetidas a ação da papaína, e bovina pela ação da neutrase. Essa variação em relação a ação enzimática pode ser atribuída à especificidade ligeiramente maior de uma enzima pela caseína de determinada espécie em relação a outra, dependendo tanto do tempo de hidrólise quanto do sítio de clivagem (ABDEL-HAMID et al., 2017; AYYASH et al., 2018).

Abdel-Hamid et al. (2017) ao utilizar uma relação enzima: substrato (1:10) maior que a do presente estudo (1:100) de papaína, pepsina e tripsina comercial para hidrólise de caseinato bubalino observou GH% entre 23 e 33%, em 4h de hidrólise com aumento relativo em relação ao tempo, resultados inferiores aos encontrados neste trabalho. Luo et al. (2014) obtiveram 20,43% de grau de hidrólise com tratamento enzimático ao submeter caseinato bovino a ação proteolítica da papaína comercial em um período de 8 horas, o que demonstra o

alto potencial de hidrólise dos caseinatos estudados e os altos graus de hidrólises obtidos no presente estudo.

3.2 Eliminação do radical Hidroxila

É possível observar que o potencial de eliminação do radical hidroxila entre as espécies (Tabela 2), de modo geral, foi maior para o hidrolisado caprino (4,82 a 100%) e menor para o caseinato bovino (12,14 a 66,67%), enquanto que o hidrolisado bubalino apresentou potencial intermediário a depender dos fatores enzima e tempo.

Tabela 2. Eliminação do radical hidroxila (%) dos hidrolisados obtidos pela ação de bromelina, papaína, tripsina e neutrase sobre a caseína do leite bubalino, bovino e caprino após 480 minutos de hidrólise.

Caseinato	Tempo (minutos)							
	0	30	60	120	240	360	480	
BRO	CBUB	55,95Ba	34,52Aa	27,14Aa	40,71Aa	22,38Ba	32,81Aa	10,24Aa
	CBOV	19,29Aa	29,52Aa	24,52Aa	38,10Aa	33,10Ba	28,57Aa	34,76Aa
	CCAP	45,18Ba	39,82Aa	41,73Aa	32,56Aa	57,68Aa	18,39Aa	18,51Aa
	CV 1 (%) = 80,50				CV 2 (%) = 50,40			
PAP	CBUB	45,47Ba	28,95Ab	13,81Ab	38,33Ab	45,47Ab	10,45Ab	69,53Ab
	CBOV	33,10Aa	37,38Aa	24,29Aa	12,85Aa	22,62Aa	27,86Aa	15,71Aa
	CCAP	36,96Ba	5,41Aa	13,63Aa	4,82Aa	7,92Aa	13,75Aa	23,99Aa
	CV 1 (%) = 92,24				CV 2 (%) = 92,21			
TRI	CBUB	10,48Aa	13,33Aa	13,57Aa	18,10Aa	21,67Aa	15,00Aa	11,67Aa
	CBOV	13,33Aa	40,95Aa	25,71Aa	43,57Aa	45,71Aa	21,43Aa	25,71Aa
	CCAP	98,99Ba	39,94Ab	47,80Ab	21,60Ab	32,08Ab	30,65Ab	50,89Ab
	CV 1 (%) = 102,14				CV 2 (%) = 70,56			
NEU	CBUB	56,19Aa	13,33Ab	19,52Ab	82,62Aa	84,05Aa	94,05Aa	79,05Aa
	CBOV	33,10Aa	45,95Aa	12,14Aa	11,43Ba	31,91Aa	29,52Ba	66,67Aa
	CCAP	20,42Ab	8,39Ab	41,96Ab	88,27Aa	70,18Aa	100Aa	100Aa
	CV 1 (%) = 52,63				CV 2 (%) = 66,51			

Os valores médios que carregam letras diferentes nas colunas (letras maiúsculas) e nas linhas (letras minúsculas) diferem significativamente ($p < 0,05$). Brom: bromelina; Pap: Papaína; Tri: Tripsina; Neu: neutrase. CBUB: Caseinato bubalino hidrolisado; CBOV: caseinato bovino hidrolisado; CCAP: caseinato caprino hidrolisado. CV 1 (%): Coeficiente de variação do caseinato; CV 2 (%): Coeficiente de variação do tempo de hidrólise.

A neutrase destacou-se na clivagem do caseinato para obtenção de hidrolisados ricos em peptídeos capazes de eliminar o radical hidroxila com capacidade de 79,05%, 66,67% e 100% para os hidrolisados provenientes de caseinato bubalino, bovino e caprino, respectivamente após 8 horas de hidrólise, tabela 2.

Em relação a especificidade das enzimas, a tripsina e a bromelina apresentaram baixa capacidade de hidrolisar a caseína bubalina em pontos que gerassem peptídeos capazes de se ligar ao radical hidroxila. O mesmo comportamento foi observado para o caseinato bovino (papaína) e caprino

(bromelina e papaína) que geraram peptídeos com pouca habilidade para sequestrar o radical hidroxila. Esses resultados podem ser explicados segundo Lu et al. (2010) e Chakrabart, Jahandideh e Wu (2014) que afirmam que o radical superóxido apresenta baixa reatividade com moléculas orgânicas, o que dificulta o sequestro desse radical na ausência de um metal de transição.

A capacidade de eliminação do radical hidroxila é pouco explorada devido a complexidade das reações envolvidas, bem como a dificuldade de obtenção de material com esta atividade biológica. Silvestre et al. (2013) obtiveram capacidade anti-hidroxila de 15,48 a 49,78% ao empregar protease de *Aspergillus sojae* e 37,81 a 60% com pancreatina comercial por 5 horas de hidrólise em diferentes concentrações de enzima: substrato utilizando soro de leite como fonte proteica, resultados semelhantes ao do presente estudo o que demonstra a pontencialidade do emprego de enzimas comerciais para obtenção de peptídeos bioativos anti-hidroxila oriundos de diferentes caseinados.

3.3 Eliminação do radical superóxido

Houve diferença significativa entre os caseinatos sobre ação da neutrase e tripsina na eliminação do radical ânion superóxido ($p < 0,05$), não sendo observado o mesmo comportamento para os caseinatos quando submetidos ao tratamento com bromelina e papaína. De maneira geral, os hidrolisados oriundos da espécie bovina apresentaram maior potencial para eliminar o ânion superóxido,(Tabela 3).

A capacidade de eliminação do ânion superóxido foi superior a 80% para os hidrolisados obtidos pela ação da bromelina e papaína, não apresentando diferença significativa entre os tempos de hidrólise, exceto entre o tempo 0 para o CCAP. Os hidrolisados obtidos pela ação da tripsina sobre a caseína bubalina apresentaram maior potencial de eliminação do radical quando comparada as demais espécies, apresentando entre 13,65 e 35,95 %. Os hidrolisados obtidos pela ação da neutrase sobre o CBOV demonstraram maiores resultados, entre 13,69 e 44,19%, enquanto que os hidrolisados caprinos frente a mesma enzima não demonstraram potencial para eliminar o radical ânion superóxido.

Tabela 3. Eliminação do radical superóxido (%) dos hidrolisados obtidos pela ação de bromelina, papaína, tripsina e neutrase sobre a caseína do leite bubalino, bovino e caprino após 8 horas de hidrólise.

		Tempo (minutos)						
Caseinato		0	30	60	120	240	360	480
Bro	CBUB	93,51Aa	94,50Aa	93,92Aa	91,98Aa	91,13Aa	86,89Aa	94,23Aa
	CBOV	87,43Aa	87,97Aa	90,00Aa	89,32Aa	83,38Aa	90,81Aa	87,03Aa
	CCAP	81,71Ab	84,96Ab	87,61Ab	93,78Ab	91,22Ab	94,59Ab	48,24Ab
		CV 1 (%) = 15,18			CV 2 (%) = 23,74			
Pap	CBUB	90,63Ba	94,37Aa	95,05Aa	97,84Ba	94,87Aa	94,50Aa	95,45Aa
	CBOV	75,81Aa	88,65Ab	91,49Ab	84,72Ab	90,54Ab	88,92Ab	89,32Ab
	CCAP	92,97Ba	88,15Aa	92,97Aa	88,06Aa	94,10Aa	91,71Aa	90,54Aa
		CV 1 (%) = 4,22			CV 2 (%) = 6,92			
Tri	CBUB	35,68Aa	35,95Aa	20,54Ab	15,40Ac	15,41Bc	13,65Bc	17,70Aa
	CBOV	0,00Bb	25,31Ba	16,76Aa	20,68Aa	23,11Aa	20,74Aa	0,00Bb
	CCAP	0,00Bd	27,16Ba	14,86Bb	10,41Bc	9,59Bc	0,00Bd	0,00Bd
		CV 1 (%) = 20,95			CV 2 (%) = 27,41			
Neu	CBUB	12,03Aa	18,44Aa	14,32Ba	1,76Ba	0,00Bb	0,00Bb	0,00Bb
	CBOV	13,69Ab	34,19Aa	37,43Aa	36,35Aa	33,65Aa	56,89Ab	44,19Ab
	CCAP	18,11Aa	0,00Bb	0,00Bb	0,00Bb	0,00Bb	0,00Bb	0,00Bb
		CV 1 (%) = 89,74			CV 2 (%) = 68,36			

Os valores médios que carregam letras diferentes nas colunas (letras maiúsculas) e nas linhas (letras minúsculas) diferem significativamente ($p < 0,05$). Brom: bromelina; Pap: Papaína; Tri: Tripsina; Neu: neutrase. CBUB: Caseinato bubalino hidrolisado; CBOV: caseinato bovino hidrolisado; CCAP: caseinato caprino hidrolisado. CV 1 (%): Coeficiente de variação do caseinato; CV 2 (%): Coeficiente de variação do tempo de hidrólise.

As atividades biológicas de eliminação dos radicais hidroxila e superóxido encontradas no presente trabalho indicam a potencialidade dos hidrolisados obtidos pela ação enzimática das proteases, sobre os diferentes caseinatos, demonstrando a importância destes na eliminação dos radicais livres mais conhecidos, os quais são oriundos sobretudo das reações endógenas de oxidação no interior das células, incluindo OH^- , O^2 , HO^2 e ROO (LIU et al., 2016).

3.4 Eliminação do radical DPPH

Os hidrolisados proteicos obtidos pela ação de diferentes enzimas em um tempo de hidrólise total de 8 horas apresentaram eficiente potencial para atividade extinção do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil), excetuando-se a neutrase e a tripsina que clivaram os caseinatos em sequências peptídicas que não exibiram capacidade de sequestrar o radical DPPH (Tabela 4), apresentando diferença estatística ($p < 0,05$).

Houve diferença estatística entre os caseinatos, dependendo do tratamento enzimático e do tempo avaliado, exceto os hidrolisados obtidos pela ação da neutrase pela ausência da capacidade de sequestrar o radical DPPH. Neste sentido, a espécie bovina destaca-se das demais em relação a atividade

de eliminação do radical por apresentar atividade entre 0,00 e 41,71% com variação resultante do tratamento enzimático e do tempo de exposição.

Tabela 4. Eliminação do radical DPPH (%) dos hidrolisados obtidos pela ação de bromelina, papaína, tripsina e neutrase sobre a caseína do leite bubalino, bovino e caprino após 480 minutos de hidrólise.

		Tempo (minutos)						
Caseinato		0	30	60	120	240	360	480
BRO	CBUB	16,00Bc	30,17Ba	25,97Ba	30,17Ba	28,00Ba	28,70Ba	27,58Ba
	CBOV	21,84Ac	28,48Bb	39,93Aa	39,04Aa	41,52Aa	41,71Aa	41,38Aa
	CCAP	9,26Cc	40,58Aa	38,90Aa	39,13Aa	37,12Aa	38,53Aa	27,25Aa
		CV 1 (%) = 9,38				CV 2 (%) = 9,34		
PAP	CBUB	2,77Cb	32,14Ba	32,18Ba	33,26Aa	31,16Aa	29,96Ba	28,91Ba
	CBOV	24,26Ab	41,38Aa	38,25Aa	38,11Aa	39,42Aa	39,18Aa	39,65Aa
	CCAP	13,26Bc	39,65Aa	43,81Aa	42,92Aa	37,17Aa	40,44Aa	29,82Aa
		CV 1 (%) = 5,30				CV 2 (%) = 12,91		
TRI	CBUB	0,00Ab	0,00Bb	17,33Aa	18,18Aa	21,75Aa	25,61Ba	0,00Ab
	CBOV	0,00Ab	17,52Aa	18,78Aa	18,18Aa	3,51Ca	0,00Ab	0,00Ab
	CCAP	0,73Ab	4,44Bb	11,30Aa	7,74Ba	11,62Ba	2,04Ab	0,00Ab
		CV 1 (%) = 51,33				CV 2 (%) = 54,33		
NEU	CBUB	0,00Aa	0,00Aa	0,00Aa	0,00Aa	0,00Aa	0,00Aa	0,00Aa
	CBOV	0,00Aa	0,00Aa	0,00Aa	0,00Aa	0,00Aa	0,00Aa	0,00Aa
	CCAP	0,00Aa	0,00Aa	0,00Aa	0,00Aa	0,00Aa	0,00Aa	0,00Aa
		CV 1 (%) = 0,00				CV 2 (%) = 0,00		

Os valores médios que carregam letras diferentes nas colunas (letras maiúsculas) e nas linhas (letras minúsculas) diferem significativamente ($p < 0,05$). Brom: bromelina; Pap: Papaína; Tri: Tripsina; Neu: neutrase. CBUB: Caseinato bubalino hidrolisado; CBOV: caseinato bovino hidrolisado; CCAP: caseinato caprino hidrolisado. CV 1 (%): Coeficiente de variação do caseinato; CV 2 (%): Coeficiente de variação do tempo de hidrólise.

O radical DPPH, que ao encontrar uma substância doadora de próton, como um peptídeo antioxidante, pode ser eliminado e a absorvância reduzida (ZHU et al., 2006; YANG et al., 2011).

Os resultados encontrados no presente trabalho demonstram a alta capacidade dos hidrolisados provenientes das três espécies quando submetidas a ação proteolítica da bromelina e da papaína em sequestrar o DPPH, demonstrando a presença de substâncias doadoras nos peptídeos obtidos. Silvestre et al. (2013) ao avaliarem o uso de pectina comercial e uma protease microbiana na obtenção de peptídeos bioativos observaram a atividade de eliminação de DPPH entre 15,48 e 60,67% em 300 minutos, semelhantes aos obtidos nesse estudo. O que demonstra o alto potencial antioxidante dos hidrolisados obtidos empregando tratamentos enzimáticos com ação da bromelina, tripsina, papaína e neutrase.

3.5 Eliminação do radical ABTS

Em relação a atividade de eliminação do radical ABTS (Tabela 5) não foram observadas diferenças significativas na maioria dos hidrolisados das diferentes espécies e os tempos de hidrólise ($p < 0,05$). Segundo Duarte Neto (2015) o radical ABTS é reduzido a um produto incolor na presença de moléculas antioxidantes capazes de doar hidrogênio ou quebrar as cadeias levando a diminuição desse radical ao meio, tem sido amplamente utilizado para testar a capacidade de compostos naturais atuarem como eliminadores de radicais livres, ou doadores de hidrogênio, como forma de avaliar os seus potenciais antioxidantes.

No presente estudo foi observada atividade anti-radical ABTS superior a 85%, o que demonstra alto potencial de eliminação desse radical em todos os tempos avaliados. Observou-se que a velocidade de sequestro do radical é diferente entre as enzimas Bromelina>papaína>tripsina> neutrase.

Tabela 5. Eliminação do radical ABTS (%) dos hidrolisados obtidos pela ação de bromelina, papaína, tripsina e neutrase sobre a caseína do leite bubalino, bovino e caprino no período de 480 minutos de hidrólise.

		Tempo (minutos)						
Caseinato		0	30	60	120	240	360	480
BRO	CBUB	1,62Ab	94,57Aa	94,87Aa	96,46Aa	97,21Aa	97,41Aa	99,40Aa
	CBOV	1,63Ac	67,75Ab	97,51Aa	98,16Aa	98,55Aa	99,00Aa	99,40Ba
	CCAP	0,00Ab	97,10Aa	97,40Aa	98,16Aa	98,75Aa	99,40Aa	0,00Cb
		CV 1 (%) = 15,74						CV 2 (%) = 15,28
PAP	CBUB	1,63Ab	98,01Aa	98,31Aa	98,95Aa	96,36Ba	98,85Aa	99,30Aa
	CBOV	0,00Ab	99,15Aa	99,55Aa	99,55Aa	99,50Aa	99,45Aa	99,47Aa
	CCAP	0,00Ab	99,05Aa	99,25Aa	99,15Aa	99,40Aa	99,35Aa	1,63Ba
		CV 1 (%) = 1,04						CV 2 (%) = 1,24
TRI	CBUB	1,63Aa	99,30Aa	99,65Aa	99,45Aa	99,45Aa	99,20Aa	99,20Aa
	CBOV	0,00Ac	99,30Aa	93,87Bb	99,35Aa	99,55Aa	98,45Aa	1,63Bc
	CCAP	0,00Ab	98,36Aa	97,91Aa	99,25Aa	99,96Aa	99,56Aa	1,62Bb
		CV 1 (%) = 3,35						CV 2 (%) = 3,31
NEU	CBUB	1,62Ab	99,05Aa	99,60Aa	99,05Aa	99,50Aa	99,11Ba	99,35Ba
	CBOV	0,00Bd	98,40Ab	98,05Ab	100Aa	100Aa	100Aa	1,63Ac
	CCAP	0,00Bc	97,46Ab	98,85Ab	98,70Aa	98,80Aa	97,76Bb	100Aa
		CV 1 (%) = 1,34						CV 2 (%) = 1,18

Os valores médios que carregam letras diferentes nas colunas (letras maiúsculas) e nas linhas (letras minúsculas) diferem significativamente ($p < 0,05$). Brom: bromelina; Pap: Papaína; Tri: Tripsina; Neu: neutrase. CBUB: Caseinato bubalino hidrolisado; CBOV: caseinato bovino hidrolisado; CCAP: caseinato caprino hidrolisado. CV 1 (%): Coeficiente de variação do caseinato; CV 2 (%): Coeficiente de variação do tempo de hidrólise.

Os resultados obtidos no presente estudo diferem dos encontrados por Gobba et al. (2014) que obtiveram atividade de eliminação de ABTS entre 47 e 87% ao avaliar os hidrolisados derivados do caseinato caprino submetido a ação de subtilina e tripsina por 12 horas de hidrólise.

3.6 Atividade Quelante de Ferro

Os hidrolisados oriundos do CBOV, CBUB e CCAP submetidos aos diferentes tratamentos enzimáticos apresentaram atividade de quelação de ferro (tabela 6). Observou-se atividade de quelação de ferro entre 0,00 e 100% de capacidade de quelar o metal de transição apresentando maior ou menor potencial em função do tempo, enzima e a espécie da fonte proteica.

Tabela 6. Quelante de ferro (%) dos hidrolisados obtidos pela ação de bromelina, papaína, tripsina e neutrase sobre a caseína do leite bubalino, bovino e caprino após 480 minutos de hidrólise.

		Tempo (minutos)						
Caseinato		0	30	60	120	240	360	480
BRO	CBUB	47,53Aa	55,70Aa	53,60Aa	60,95Aa	55,54Ba	46,14Ba	0,00Bb
	CBOV	41,64Ac	66,63Aa	67,45Aa	76,23Aa	91,63Ab	65,45Aa	53,38Ac
	CCAP	32,56Aa	40,68Ba	0,00Bc	0,00Bc	8,74Cb	25,19Ca	36,70Aa
		CV 1 (%) = 13,57			CV 2 (%) = 23,99			
PAP	CBUB	55,48Aa	73,32Aa	68,41Aa	68,63Aa	87,90Aa	74,65Aa	67,77Aa
	CBOV	32,51Aa	66,65Aa	61,79Aa	63,45Aa	55,00Aa	60,80Aa	70,35Aa
	CCAP	39,30Aa	57,75Aa	59,15Aa	56,26Aa	59,60Aa	66,36Aa	76,31Aa
		CV 1 (%) = 26,61			CV 2 (%) = 20,34			
TRI	CBUB	42,25Ab	62,22Bb	55,98Ab	69,12Aa	74,70Aa	81,06Aa	88,98Aa
	CBOV	46,58Ab	39,38Ab	57,27Aa	69,97Aa	63,81Aa	61,63Ba	60,52Ba
	CCAP	54,60Aa	63,71Ba	44,05Aa	60,90Aa	71,28Aa	66,86Ba	64,60Ba
		CV 1 (%) = 18,54			CV 2 (%) = 16,84			
NEU	CBUB	71,11Ba	57,69Ba	58,24Ba	53,54Ba	45,43Ba	38,28Ba	62,39Ba
	CBOV	35,24Ca	71,84Ba	61,52Ba	54,37Ba	56,52Ba	49,59Ba	42,28Ba
	CCAP	100Aa	100Aa	100Aa	100Aa	100Aa	100Aa	100Aa
		CV 1 (%) = 20,72			CV 2 (%) = 18,27			

Os valores médios que carregam letras diferentes nas colunas (letras maiúsculas) e nas linhas (letras minúsculas) diferem significativamente ($p < 0,05$). Brom: bromelina; Pap: Papaína; Tri: Tripsina; Neu: neutrase. CBUB: Caseinato bubalino hidrolisado; CBOV: caseinato bovino hidrolisado; CCAP: caseinato caprino hidrolisado. CV 1 (%): Coeficiente de variação do caseinato; CV 2 (%): Coeficiente de variação do tempo de hidrólise.

No que diz respeito a ação enzimática para obtenção de hidrolisados e peptídeos nos diferentes caseinatos observou-se que houve diferença significativa quando submetidos a ação da neutrase no tempo 0 e tripsina nos tempos 30, 360 e 480 minutos, destacando o caseinato caprino que apresentou potencial máximo. Não foi observado diferença entre os caseinatos quando submetidos a ação da papaína, tripsina e bromelina, excetuando o CBUB que apresenta diferença entre os tempos de hidrólise.

De maneira análoga, o tempo não apresentou efeito significativo em relação a obtenção de hidrolisados com a capacidade quelante de ferro, ou seja,

independentemente do tempo empregado na clivagem dos caseinatos foi possível obter pequenos fragmentos proteicos capazes de quelar o ferro.

O caseinato bubalino submetido a ação enzimática apresentou maior capacidade de quelação quando comparado as demais espécies em relação a neutrase 28,28 a 35,93%, tripsina 5,25 a 74,30%, papaína 32,39 a 72,88% e bromelina 18,81 a 79,83. Há uma relação entre o aumento no GH% e o aumento da atividade quelante de ferro nos hidrolisados oriundos da espécie bubalina, o mesmo não foi observado nos hidrolisados das demais espécies.

3.7 Atividade Quelante de Cobre

Os hidrolisados da espécie caprina apresentaram resultados entre 0,20 e 79,02%, já os fragmentos proteicos oriundos do caseinato bovino apresentaram capacidade de quelar cobre entre 13,08 e 73,08% e o bubalino entre 5,25 e 79,83%, variando com a enzima e do tempo de hidrólise. Os maiores valores de quelação de cobre foram observados nos hidrolisados obtidos empregando papaína e bromelina, entretanto, não se observou diferença significativa entre os caseinatos, o mesmo ocorreu com a espécie caprina para tais enzimas (tabela 7).

Observa-se que os hidrolisados originados da ação proteolítica da neutrase demonstrou menores potenciais de quelação de ferro para as três espécies avaliadas.

Bambad et al. (2017) avaliaram o efeito da pressão atmosférica e de diferentes enzimas na hidrólise de lactoglobulina e obtiveram resultados semelhantes ao do presente estudo, a capacidade de quelação de ferro observado foi de 16 a 92% empregando cinco proteases comerciais (Neutrase, alcalase, savinase, elastase, termolisina e tripsina).

A atividade de quelação de íons ferro e cobre está relacionada a atividade antioxidante devido à importância desses metais na catálise de espécies reativas de oxigênio, sendo extremamente importantes na eliminação dos radicais hidroxila e o superóxido, que podem ocasionar peroxidação lipídica e dano ao DNA (ZHANG et al., 2010; ZHUANG et al., 2013).

Tabela 7. Quelante de cobre (%) dos hidrolisados obtidos pela ação de bromelina, papaína, tripsina e neutrase sobre a caseína do leite bubalino, bovino e caprino no período de 480 minutos de hidrólise.

Caseinato	Tempo (minutos)							
	0	30	60	120	240	360	480	
BRO	CBUB	18,81Bc	79,83Aa	74,71Aa	73,23Aa	61,54Bb	72,88Aa	72,90Aa
	CBOV	27,67Ac	73,08Aa	67,12Aa	66,84Aa	54,39Ba	70,07Ab	69,78Aa
	CCAP	33,33Ab	74,54Aa	73,93Aa	65,18Aa	73,93Aa	75,87Aa	64,81Aa
CV 1 (%) = 9,86				CV 2 (%) = 10,16				
PAP	CBUB	52,95Aa	32,39Cb	65,33Aa	59,10Aa	72,18Aa	63,88Aa	72,88Aa
	CBOV	17,53Bb	54,02Ba	59,41Aa	59,32Aa	66,38Aa	55,05Aa	64,86Aa
	CCAP	32,70Bb	76,63Aa	78,88Aa	77,24Aa	67,28Aa	79,20Aa	75,37Aa
CV 1 (%) = 34,55				CV 2 (%) = 20,27				
TRI	CBUB	5,25Ab	63,63Bb	72,44Aa	58,16Aa	60,82Aa	74,30Aa	64,75Aa
	CBOV	13,80Ab	45,19Aa	37,76Aa	55,30Aa	46,00Aa	45,48Ba	41,22Ba
	CCAP	0,20Ab	26,00Bb	32,74Aa	40,72Aa	41,64Aa	46,44Ba	52,33Ba
CV 1 (%) = 29,29				CV 2 (%) = 27,39				
NEU	CBUB	29,06Aa	28,60Aa	28,28Aa	26,82Aa	30,65Aa	30,65Aa	35,93Aa
	CBOV	19,56Ba	23,72Aa	25,05Aa	30,30Aa	24,57Aa	19,69Ba	29,66Aa
	CCAP	9,65Cc	37,31Ba	24,23Ab	22,83Ab	9,77Bc	14,74Bc	21,19Bb
CV 1 (%) = 31,08				CV 2 (%) = 21,59				

Os valores médios que carregam letras diferentes nas colunas (letras maiúsculas) e nas linhas (letras minúsculas) diferem significativamente ($p < 0,05$). Brom: bromelina; Pap: Papaína; Tri: Tripsina; Neu: neutrase. CBUB: Caseinato bubalino hidrolisado; CBOV: caseinato bovino hidrolisado; CCAP: caseinato caprino hidrolisado. CV 1 (%): Coeficiente de variação do caseinato; CV 2 (%): Coeficiente de variação do tempo de hidrólise.

Sendo assim, a presença da capacidade de quelar ferro e cobre presente nos hidrolisados desse estudo podem desempenhar papel importante no controle do estresse oxidativo, já que, o acúmulo excessivo desses metais de transição pode acarretar em estresse oxidativo, associado a diversas patologias, como doenças degenerativas, doenças cardiovasculares, hiperglicemia, entre outros (JOMOVA; ALKO, 2011).

Além disso, hidrolisados derivados da caseína e das lactoproteínas apresentam multifuncionalidades que podem ser empregadas como ingredientes que visam melhorar a funcionalidade de alimentos na indústria, uma vez que aumenta seu valor nutricional ou biológico, atua prevenindo reações oxidativas nos alimentos processados acarretando, no aumento do tempo de prateleira, e também, na saúde humana (GOBBA et al., 2014; LUO et al., 2014; AHMED et al., 2015).

4. Conclusão

Os hidrolisados proteicos obtidos do caseinato bubalino, bovino e caprino pela ação das proteases vegetal (bromelina e papaína), microbiana (neutrase) e animal (tripsina) apresentam potencial para eliminação dos radicais ABTS (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazol-6-ácido sulfônico), DPPH (2,2-difenil-1-

picrilidrasil), superóxido, hidroxila e quelação de ferro e cobre. Por conseguinte, em termos gerais, os hidrolisados oriundos do caseinato bubalino apresenta maior potencial antioxidante. O tempo de 240 minutos mostra mais promissor para a liberação de peptídeos bioativos com multifuncionalidades. Todas as enzimas apresentam capazes de hidrolisar os caseinatos e originar peptídeos bioativos com atividade biológica diferenciada. O que resulta em implicações extremamente encorajadores para a utilização futura dos hidrolisados proteicos derivados da caseína na indústria de alimentos seja como antioxidante natural, alimento funcional ou nutracêutico.

Referências

ABDEL-HAMID, M. et al. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity and antioxidant capacity of bioactive peptides derived from enzymatic hydrolysis of buffalo milk proteins. **International Dairy Journal**, v. 66, p. 91-98, 2017.

ABDEL-HAMID, M.; et al. Antibacterial activity of papain hydrolysed camel whey and its fractions. **International Dairy Journal**, v. 61, p.91-98, 2016.

AGRAWAL, H; JOSHI, R; GUPTA, M. Isolation and characterisation of enzymatic hydrolysed peptides of green tender sorghum and their antioxidant activities. **LWT-Food Science and Technology**, v.84, p.608 -616, 2017.

AGYEI, D. et al. Bioprocess challenges to the isolation and purification of bioactive peptides. **Food and bioproducts processing**, v.98, p.244-356, 2015.

AHMED, Ahmed S. et al. Identification of potent antioxidant bioactive peptides from goat milk proteins. **Food Research International**, v. 74, p. 80-88, 2015.

AYYASH, et al. In vitro investigation of anticancer and ACE-inhibiting activity, α -amylase and α -glucosidase inhibition, and antioxidant activity of camel milk fermented with camel milk probiotic: a comparative study with fermented bovine milk. **Food Chemistry**,v.239, p.588-597, 2018.

BAMDAD, F. et al. Anti-Inflammatory and antioxidant properties of casein hydrolysate produced using high hydrostatic pressure combined with proteolytic enzymes. **Molecules**, v. 22, n. 4, p. 609, 2017.

BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, 2010.

BENJAKUL, S.; MORRISSEY, M.T. Protein hydrolysates from pacific whiting solid wastes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, p.3423–3430, 1997.

CHAKRABARTI, S; JAHANDIDEH, F; WU, J. Food-derived bioactive peptides on inflammation and oxidative stress. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

DE GOBBA, C. et al. Antioxidant peptides from goat milk protein fractions hydrolysed by two commercial proteases. **International Dairy Journal**, v. 39, n. 1, p. 28-40, 2014.

DUAN, X. et al. Evaluation of antioxidant property of extract and fractions obtained from a red alga, *Polysiphonia urceolata*. **Food Chemistry**, v. 95, n. 1, p. 37-43, 2006.

DUARTE NETO, J.M.W. et al. Production of antioxidant hydrolysate from bovine casein using immobilized *Penicillium aurantiogriseum* protease on magnetic nanoparticles. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 3149-3155, 2015.

EGITO, A. S. et al. Milk-clotting activity of enzyme extracts from sunflower and albizia seeds and specific hydrolysis of bovine κ -casein. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 7, p. 816-825, 2007.

GÓMEZ-RUIZ, J. A. et al. Antioxidant activity of ovine casein hydrolysates: identification of active peptides by HPLC-MS/MS. **European Food Research and Technology**, v. 227, n. 4, p. 1061-1067, 2008.

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; DÁVALOS, A.; BARTOLOMÉ, B.; Amigo, L. Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from α -lactalbumin and β -lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.588-593, 2005.

JOMOVA, K.; VALKO, M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. **Toxicology**, v. 283, n. 2, p. 65-87, 2011.

JRAD, Z. et al. Antioxidant activity of camel milk casein before and after in vitro simulated enzymatic digestion. **Mljekarstvo/Dairy**, v. 64, n. 4, p. 287-294, 2014.

KEPEKÇI, Remziye Aysun et al. Protective effect of *Spirulina platensis* enriched in phenolic compounds against hepatotoxicity induced by CCl₄. **Food chemistry**, v. 141, n. 3, p. 1972-1979, 2013.

KORHONEN, H.; PIHLANTO, A. Bioactive peptides: Production and functionality. **International Dairy Journal**, v.16, n.9, p.945-960, 2006.

LASSOUED, I. et al. Bioactive peptides identified in thornback ray skin's gelatin hydrolysates by proteases from *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens*. **Journal of Proteomics**, v.128, p.8-17, 2015.

LIU, R. et al. A review of antioxidant peptides derived from meat muscle and by-products. **Antioxidants**, v. 5, n. 3, p. 32, 2016.

LÜ, J. et al. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 14, n. 4, p. 840-860, 2010.

LUO, Y. et al. Physical, chemical and biochemical properties of casein hydrolyzed by three proteases: Partial characterizations. **Food Chemistry**, v. 155, p. 146-154. 2014.

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. **The FEBS Journal**, v. 47, n. 3, p. 469-474, 1974.

MASON, J.M. Design and development of peptides and peptide mimetics as antagonists for therapeutic intervention. **Future Medicinal Chemistry**, v.2, p.1813-1822, 2010.

McCLEMENTS, D. J. et al. Enhancing nutraceutical performance using excipient foods: designing food structures and compositions to increase bioavailability. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 14, n. 6, p. 824-847, 2015.

MIGUEL, M. et al. Angiotensin I–converting enzyme inhibitory activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 9, p. 1914-1920, 2004.

PIHLANTO, A. Antioxidative peptides derived from milk proteins. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 11, p. 1306-1314, 2006

RAIKOS, V.; DASSIOS, T. Health-promoting properties of bioactive peptides derived from milk proteins in infant food: a review. **Dairy Science & Technology**, v. 94, p 91 -101, 2014.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 1231 -1237, 1999.

RYAN, J.T. et al. Bioactive peptides from muscle sources: meat and fish. **Nutrients**, v.3, p.765-791, 2011

SAIGA, A. I.; TANABE, S.; NISHIMURA, T. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 12, p. 3661-3667, 2003.

SÁNCHEZ-VIOQUE, R. et al. In vitro antioxidant and metal chelating properties of corm, tepal and leaf from saffron (*Crocus sativus* L.). **Industrial Crops and Products**, v. 39, p. 149-153, 2012.

SBROGGIO, M. F. et al. Influence of the degree of hydrolysis and type of enzyme on antioxidant activity of okara protein hydrolysates. **Food Science and Technology**, v. 36, n. 2, p. 375-381, 2016.

SILA, A.; BOUGATEF, A. Antioxidant peptides from marine by-products: Isolation, identification and application in food systems. A review. **Journal of Functional Foods**, v. 21, p. 10-26, 2016.

SILVESTRE, M.P.S. et al. Whey as a source of peptides with high antioxidant activity: use of pancreatin and *Aspergillus sojae* protease. **Publicações UEPG Ciências Biológicas e Saúde**, Ponta Grossa, v.19, n.2, p. 143-147, 2013.

SILVESTRE, Marialice Pinto Coelho et al. Whey as source of peptides with high antioxidant activity: use of a pancreatin and an *Aspergillus sojae* protease. **Publicatio UEPG: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 19, n. 2, p. 143-147, 2014.

WANG, L. et al. Isolation and characterisation of in vitro and cellular free radical scavenging peptides from corn peptide fractions. **Molecules**, v. 20, n. 2, p. 3221-3237, 2015.

YANG, P. et al. Antioxidant activity of bigeye tuna (*Thunnus obesus*) head protein hydrolysate prepared with Alcalase. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 46, n. 12, p. 2460-2466, 2011.

YEN, G.C.; CHEN, H.Y. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.43, 27-37, 1995.

ZHANG, L. et al. Inhibitory effect of raspberries on starch digestive enzyme and their antioxidant properties and phenolic composition. **Food Chemistry**, v. 119, n. 2, p. 592-599, 2010.

ZHANG, Y. et al. Comparison of dipeptidyl peptidase IV-inhibitory activity of peptides from bovine and caprine milk casein by in silico and in vitro analyses. **International Dairy Journal**, v. 53, p. 37-44. 2016.

ZHU, K.X.; ZHOU, H.M.; QIAN, H.F. Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. **Process Biochemistry**. v.41, p.1296–1302, 2006.

ZHUANG, H.; TANG, N.; YUAN, Y. Purification and identification of antioxidant peptides from corn gluten meal. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 4, p. 1810-1821, 2013.

CAPITULO 2

Fracionamento dos peptídeos derivados da caseína bubalina e caracterização das suas atividades antidiabética, antioxidante anti-hipertensiva e antibacteriana

A ser submetido à revista:



TITULO: Fracionamento dos peptídeos derivados da caseína bubalina e caracterização das suas atividades antidiabética, antioxidante anti-hipertensiva e antibacteriana

Resumo

Objetivou-se a hidrólise e o fracionamento empregando ultrafiltração dos hidrolisados derivados do caseinato bubalino sob ação de diferentes proteases e a determinação do seu potencial antioxidante, antidiabético, anti-hipertensivo e antimicrobiano. As frações dos hidrolisados derivados da caseína foram analisados quanto a capacidade de eliminação dos radicais ácido 2,2'-azino-bis (3- etilbenzotiazolína -6-sulfônico) (ABTS), 2,2'-difeníl-1-picrilidrazilo (DPPH), hidroxila, quelação de cobre e ferro, atividade antidiabética por inibição de α -glicosidase e α -amilase, inibição da enzima conversora de angiotensina e antibacteriana contra as cepas *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella sp.* e *Staphylococcus aureus*. Os testes para os radicais hidroxila e DPPH apresentaram maior potencial nas frações de 3-10 kDa e <3 kDa. Para a atividade quelante de ferro foi observado quelação superior a 70% em todas as frações, destacando-se as frações <3kDa. Já para quelação de cobre foram observados valores superiores a 60% nas frações >10 kDa. A atividade de inibição da α -glicosidase apresentou potencial variável entre as frações, enquanto que a α -amilase e a atividade antihipertensiva foram melhor inibidas pela fração <3 kDa. Observou-se atividade antibacteriana entre 3,28 e 100% de inibição contra os micro-organismos testados, a fração <3 kDa apresentou maior potencial inibitório. À atividade anti-hipertensiva das frações manteve-se entre 39,35 e 89,58%, destacando-se a fração peptídica H3. Todos os tratamentos enzimáticos foram capazes de produzir frações e hidrolisados com potencial antioxidante, antidiabético, anti-hipertensivo e antibacteriano, portanto o método de ultrafiltração se mostrou eficaz na obtenção de peptídeos com diferentes massas molares e com potencial para uso nas indústrias alimentícia ou farmacêutica.

Palavras-chave: Ultrafiltração. Leite de búfala. Alimento funcional.

1. Introdução

O búfalo é um animal domesticado em diversos continentes, como Ásia (Índia, Paquistão e China), Europa (Itália), África (Egito) e América do Sul, principalmente na Argentina e no Brasil (FAO, 2017). De acordo com o *International Dairy Federation* (2014) a produção mundial de leite bubalino apresentou taxa de crescimento anual de, aproximadamente, 3,3% superior a produção láctea bovina.

O leite de búfala apresenta entre 3,8 - 4,5% de proteína superior ao encontrado no leite bovino (EL-SALAM; EL-SHIBINY, 2011; ABDEL-HAMID et al., 2017) e, em especial, apresenta uma quantidade superior de caseína quando comparada a espécie bovina, apresentando alta homologia, cerca de 92% de semelhança entre as mesmas (ISLAM et al., 2014; SHANMUGAM et al., 2015; ABDEL-HAMID et al., 2017).

A caseína quando intacta é uma fonte de aminoácidos essenciais ao crescimento e manutenção do neonato, entretanto, por apresentar em sua estrutura uma série de peptídeos criptografados que, quando liberados por hidrólise enzimática ou fermentação, apresenta uma série de funcionalidade (SHANMUGAN et al., 2015; KUMAR et al., 2016). O produto dessa criptografia pode ser empregado como aditivos alimentares na formulação de alimentos funcionais, como produtos nutracêuticos e farmacêuticos (FOSGERAU; HOFFMANN, 2015), pois apresentam poucos efeitos colaterais negativos (NIELSEN et al., 2017).

Além disso, são descritas diversas atividades biológicas de peptídeos bioativos derivados da hidrólise enzimática de componentes da caseína bubalina, sobretudo, da fração beta, entre elas inibição da enzima conversora de angiotensina (ISLAM et al, 2014; ABDEL-HAMID et al., 2017), antioxidante (SHANMUGAN et al., 2015; ABDEL-HAMID et al 2017; SHAZLY et al., 2017) e antimicrobianos (ISLAM et al., 2014, SAINI et al., 2014).

As pesquisas em relação a proteína láctea bubalina limitam-se, em sua maioria, as proteínas do soro e em menor proporção os estudos referentes a hidrólise da caseína de búfala (ABDEL-HAMID et al., 2017; SHAZLY et al., 2017)

representando, segundo Nielsen et al. (2017), 1% do total dos estudos, objetivando a identificação e a caracterização de atividades biológicas de peptídeos bioativos derivados da proteína do leite. Sendo assim, objetivou-se hidrolisar e fracionar os hidrolisados derivados do caseinato bubalino, bem como determinar as atividades antioxidantes, antidiabética, anti-hipertensiva e antibacteriana de cada fração.

2. Materiais e métodos

2.1. Obtenção da caseína do leite

O caseinato de sódio bubalino foi obtido empregando-se metodologia descrita por Egito et al. (2007), na qual o leite foi desnatado por centrifugação a $2100 \times g$ por 30 minutos a $32 \text{ }^\circ\text{C}$, e logo depois, precipitado em pH 4,6 com HCl 1 M e novamente centrifugado. Em seguida, o precipitado foi lavado em água destilada ajustando-se para o pH 7 com NaOH 1 M. O ciclo precipitação / solubilização foi repetido por três vezes e dialisada contra água deionizada a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ e, posteriormente liofilizada.

2.2. Preparação dos hidrolisados e dos ultrafiltrados de caseinato bulbalino empregando hidrólise enzimática

Para a produção dos hidrolisados proteicos o caseinato foi solubilizado em tampão fosfato de sódio de acordo com a especificidade enzimática empregando bromelina (E.C. 3.4.22.33, Sigma – Aldrich Chemical Co., St Louis, MO, EUA), a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ e pH 6,5; papaína (E.C. 3.4.22.2, Sigma – Aldrich Chemical Co., St Louis, MO, EUA), a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ e pH 6,5; tripsina (E.C. 3.4.21.4, Sigma – Aldrich Chemical Co., St Louis, MO, EUA), a 37°C e pH 8,0 e neutrase (Novozymes, Dinamarca), a 50°C e pH 7,5, relação enzima:substrato 1:100 por 4 horas. A reação hidrolítica foi interrompida por aquecimento a $100 \text{ }^\circ\text{C}$ por 10 minutos. Os hidrolisados foram a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ até posterior utilização nas determinações analíticas.

Os hidrolisados oriundos da caseína do leite de búfala obtidos pela ação de diferentes enzimas proteolíticas foram ultrafiltrados sequencialmente através de uma unidade de ultrafiltração empregando membrana de corte (*cut off*) Amicon® Ultra-15 (Millipore Ireland Ltd, Tullagreen, Irlanda) com diferentes massas moleculares, durante 60 minutos a $4 \text{ }^\circ\text{C}$, $4000 \times g$, de acordo com a metodologia descrita por Kumar et al. (2016); os hidrolisados inteiros (H0) foram

ultrafiltrados através de uma membrana de 10 kDa, produzindo duas frações: retido (>10 kDa; H1) e permeado (≤10 kDa). O permeado foi ultrafiltrado através de uma membrana 3 kDa para obter o segundo retido ($3 \geq n \leq 10$ kDa; H2) e permeado (≤ 3 kDa; H3).

2.3. Determinação *in vitro* das atividades de eliminação de radicais livres dos hidrolisados e das frações

2.3.1. Atividade de eliminação do radical hidroxila

Os ensaios de determinação da eliminação do radical hidroxila (AERH) foi determinado de acordo com a metodologia descrita por Zhu et al. (2006), modificada. Foram misturados 30µL da amostra contendo os hidrolisados e as frações peptídicas, 50 µL de 1,10-fenantrolina (5,0 mM), 50 µL de FeSO₄ (5,0 mM), 50 µL de EDTA (15 mM) e 30 µL de tampão fosfato de sódio (0,2 M, pH 7,4) em microplacas de 96 poços de poliestireno (Corning®, Tewksbury, MA). Após 5 minutos, 60 µL de H₂O₂ foi adicionado para iniciar a reação de eliminação. A mistura reacional foi incubada por 1 h a 37 °C, a absorbância foi mensurada empregando leitor de microplaca. A atividade de eliminação do radical hidroxila foi calculado de acordo com a equação:

$$AERH (\%) = \left(\frac{A_{Amostra} - A_{Degradada}}{A_{n\tilde{a}o\ degradada} - A_{Degradada}} \right) * 100$$

Onde, o grupo degradado contém todos dos reagentes envolvidos na reação, exceto pelo uso de água em substituição a amostra. O grupo não-degradado as mesmas soluções da amostra do grupo degradado exceto pela ausência do H₂O₂.

2.3.2. Ensaio de antioxidante para atividade de eliminação do radical DPPH

O efeito de eliminação das amostras frente ao radical DPPH (2,2 -Difenil-1,4-fenilenodiamina) foi determinado de acordo com a metodologia previamente descrita por Yen e Chen (1995), modificada por Duan et al. (2006). A mistura reacional consistiu em 200 µL da amostra contendo os hidrolisados e as frações peptídicas e 200 µL de solução etanólica de DPPH 0,16 mM. A reação foi incubada por 30 min no escuro, e a absorbância foi mensurada a 517 nm. A

habilidade de eliminação do radical DPPH (EDPPH) foi calculado usando a equação:

$$ERDPPH (\%) = \left[1 - \left(\frac{A_{amostra} - A_{amostra\ branco}}{A_{controle}} \right) \right] * 100$$

Onde, o $A_{amostra}$ é a absorbância das amostras, $A_{amostra\ branco}$ é a absorbância da amostra sem o DPPH e $A_{controle}$ é a absorbância do controle (solução de DPPH sem amostra).

2.3.3. Ensaio de antioxidante para atividade de eliminação do radical ABTS

O ensaio de atividade antioxidante envolvendo a eliminação do radical cátion ABTS⁺, gerado a partir da oxidação de 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS) 7 mM com persulfato de potássio 2,45 mM, pré-incubados no escuro por 12 horas antes da utilização. A solução de ABTS⁺ foi ajustada para absorbância de 0,700±0,02 a 734 nm em espectrofotômetro, por diluição em tampão fosfato 5 mM, sendo realizado de acordo com metodologia descrita por Re et al. (1999), modificada por Hernandez-Ledesma et al. (2005). Uma alíquota de 50 µL da amostra foi misturada a 950 µL da solução diluída de ABTS⁺, a mistura reacional foi incubada por 10 minutos no escuro a temperatura ambiente (23 °C). A absorbância da reação foi mensurada a 734 nm e a atividade de eliminação do radical ABTS foi calculada de acordo com a equação:

$$Efeito\ de\ eliminação\ do\ radical\ ABTS\ (\%) = \left[\left(\frac{A_{controle} - A_{amostra}}{A_{controle}} \right) \right] * 100$$

Onde, o $A_{amostra}$ é a absorbância das amostras, e $A_{controle}$ é a absorbância do controle negativo contém tampão fosfato.

2.3.4. Atividade quelante de Fe²⁺ e Cu²⁺ do hidrolisado e das frações dos peptídeos

A atividade quelante (AQ) de ferro foi realizada de acordo com a metodologia descrita em Sánchez-Vioque et al. (2012) com modificações, empregando 125 µL dos hidrolisados e das frações peptídicas, misturados a 0,5 mL de tampão acetato de sódio (0,1 M e pH 4,9) e a 12,5 µL de solução Fe²⁺ (2 mM). Após 30 minutos de incubação, foi adicionado 50 µL de solução ferrozina (5mM), decorrido mais 30 minutos e, posteriormente, realizando a leitura 562 nm (Carter, 1971).

A atividade quelante de cobre foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Saiga et al. (2003) com modificações, em que 0,5 mL de tampão acetato de sódio (pH 6,0, 50 mM) foi misturado com 12,5 µL de solução de CuSO₄ (5mM) e 125 µL do hidrolisado ou das frações. Essa mistura foi incubada por 30 minutos e em seguida adicionado 12,5 µL da solução de violeta de pirocatecol (4mM), após mais 30 minutos de incubação, a absorbância da mistura reacional foi lida a 632 nm em espectrofotômetro.

Para ambas as atividades o controle negativo foi realizado utilizando água ao invés da amostra; o controle positivo foi realizado com solução de EDTA a 0,045%, a porcentagem de inibição foi determinada de acordo com a equação:

$$AQ (\%) = \left[\frac{(A_{\text{Controle}} - A_{\text{Amostra}})}{A_{\text{Controle}}} \right] * 100$$

2.4. Atividade inibitória da enzima α-glicosidase

Para se avaliar o potencial dos hidrolisados e das frações do caseinato bubalino como inibidores da α-glicosidase (IG%), foi utilizada a metodologia descrita por Kim et al. (2004) com modificações, em que 5 µL α-glicosidase (10 U.mL⁻¹), em tampão fosfato de potássio 0,1 M e pH 6,8) foram misturados a 10 µL da amostra de hidrolisados e a 620 µL de tampão fosfato de potássio (0,1 M e pH 6,8). A reação foi incubada por 20 minutos a 37,5 °C. Em seguida, 10 µL de p-nitro-fenil-glicopiranosídio (pNPG a 10 mM) foram adicionados à reação, que foi incubada novamente a 37,5 °C por mais 30 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 650 µL de Na₂CO₃ (1 M). O produto liberado, p-nitrofenol, pela reação foi mensurado a 410 nm e a atividade inibitória da α-glicosidase foi calculada seguindo a equação:

$$IG (\%) = \left[\frac{(A - B)}{A} \right] * 100$$

Onde “A” é a densidade ótica da reação do controle (sem as amostras dos hidrolisados) e “B” é a densidade ótica da reação realizada com as amostras dos hidrolisados.

2.5. Atividade inibitória da enzima α-amilase

A inibição da α -amilase (IA%) foi avaliada segundo metodologia de Kim et al. (2004) com poucas modificações, em que 20 μ L da α -amilase (40 U.mL⁻¹) foram misturados a 10 μ L da amostra de hidrolisados e incubados por 15 minutos a 37,5 °C. Em seguida, foram acrescentados 500 μ L de solução de amido (1% em tampão fosfato de sódio, pH 6,9 e 20 mM) e a mistura reacional incubada por mais 5 minutos. Após a incubação, 500 μ L de DNSA foram acrescentados e o ensaio levado a banho fervente por 15 minutos. A atividade da α -amilase foi mensurada a 540 nm e a sua inibição calculada segundo a equação:

$$IA (\%) = \left[\frac{(A - B)}{A} \right] * 100$$

Onde “A” é a densidade ótica da reação do controle (sem as amostras dos hidrolisados) e “B” é a densidade ótica da reação realizada com as amostras dos hidrolisados.

2.6. Ensaio anti-hipertensivo *in vitro*

A inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) foi avaliada empregando a metodologia descrita por Cushman; Cheung, (1971) com adaptações de Zhang et al. (2009), onde 25 μ L do hidrolisado e 25 μ L de ECA (5 μ M) foram adicionados a 25 μ L de Hidrato de N-Hipuril-His-Leu (HHL) (5 mM em tampão fosfato 1 M, pH 8,3), incubado a 37 °C por 30 minutos e a reação foi interrompida acrescentado 75 μ L de HCl (1M). Para extrair o ácido hipúrico, foram adicionados 500 μ L de acetato de etila, centrifugado (4000 \times g) por 10 minutos a 4 °C, posteriormente 250 μ L da fase orgânica foram transferidos para um tubo de ensaio e evaporados por 10 minutos a 100 °C. O conteúdo residual foi dissolvido em 1500 μ L de água deionizada e mensurado em espectrofotômetro a 228 nm, zerado com água deionizada. O percentual de inibição foi calculado a partir da equação:

$$Inibição da ECA (\%) = \left[\frac{A - B}{A - C} \right] * 100$$

Onde, “A” compreende a absorbância da reação contendo ECA e HHL; “B” é a absorbância da reação com o hidrolisado, ECA e HHL; “C” e a absorbância do HHL submetido a todo o ensaio.

2.7. Atividade antibacteriana

O potencial antibacteriano das frações e hidrolisados totais foi determinado pelo método de turbidez descrito por Wu et al. (2013), com modificações. Os ensaios foram realizados em placas estéreis de 96 poços (Corning®, Tewksbury, MA). As cepas *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* e *Staphylococcus aureus* foram cultivadas em caldo triptona de soja (TSB) por 10 horas a 37°C. A mistura reacional contendo 100 µL da fração peptídica com 90 µL de caldo Mueller Hinton e 10 µL da suspensão bacteriana (10^6 UFC/mL). O controle positivo para cada espécie bacteriana foi realizado empregando 90 µL de caldo Mueller-Hinton e 10 µL de inóculo de cada micro-organismo a uma concentração de 10^6 UFC/mL. O controle negativo foi realizado empregando cloranfenicol (100 mg.L^{-1}). A leitura foi realizada em leitora de microplaca a 600 nm, cada ensaio foi realizado em triplicata. Neste trabalho foram consideradas como frações inibidoras àquelas que apresentaram percentual >1% de inibição.

2.8. Análise estatística

Todas as atividades biológicas foram analisadas em triplicatas e os dados expressos como média com erro padrão. Diferenças significativas foram obtidas por análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida de avaliação de diferenças entre as médias através o teste de alcance múltiplo de Tukey, com 95% de nível de confiança no S/SVAR versão 5.6 (DEX/UFLA, BRASIL).

3. Resultados e discussão

Entre o hidrolisado total e as frações peptídicas obtidos pela ação enzimática da bromelina (HFB), a maior atividade de eliminação do radical hidroxila foi registrado para o grupo H2 ($44,07 \pm 1,97\%$), seguida de H0, H1 e H (Tabela 1). As frações H0 e H1 foram iguais e as demais frações variaram entre si estatisticamente ($p < 0,05$).

No grupo de hidrolisados e frações obtidos pela hidrólise empregando papaína (HFP) e tripsina (HFT) as maiores atividades do sequestro do radical hidroxila foi registrado para H3 ($5,54 \pm 4,63\%$) e H2 ($5,59 \pm 2,52\%$),

respectivamente. Nos hidrolisados obtidos pela ação da neutrase (HFN), a maior atividade foi observada para H3 ($44,31 \pm 0,97\%$), seguida pelas frações H2, H0 e H1. Sendo a fração H3 diferente significativamente de H0 e H1, as demais frações não diferiram entre si ($p < 0,05$).

Tabela 1. Ensaios de eliminação dos radicais hidroxila, DPPH e ABTS dos hidrolisados do caseinato bubalino e suas frações.

	HFB	HFP	HFT	HFN
Hidroxila (%)				
H0	$34,84 \pm 1,94$ ^{Ab}	$0,34 \pm 4,00$ ^{Bb}	$0,00 \pm 0,81$ ^{Bb}	$38,39 \pm 1,47$ ^{aB}
H1	$32,56 \pm 2,95$ ^{Ab}	$0,00 \pm 1,23$ ^{Bb}	$0,00 \pm 3,51$ ^{Bb}	$37,37 \pm 2,26$ ^{aB}
H2	$44,07 \pm 1,97$ ^{Aa}	$1,99 \pm 0,96$ ^{Cb}	$5,59 \pm 2,52$ ^{bA}	$41,11 \pm 2,16$ ^{aAB}
H3	$23,81 \pm 3,02$ ^{Bc}	$5,54 \pm 4,63$ ^{Ca}	$1,36 \pm 1,32$ ^{dB}	$44,31 \pm 0,97$ ^{aA}
DPPH (%)				
H0	$56,85 \pm 2,13$ ^{Aa}	$56,93 \pm 0,28$ ^{Aa}	$52,70 \pm 0,35$ ^{bB}	$45,83 \pm 0,41$ ^{Cc}
H1	$50,97 \pm 0,89$ ^{Ab}	$49,18 \pm 0,70$ ^{Ac}	$51,27 \pm 1,51$ ^{aB}	$51,43 \pm 0,73$ ^{Ab}
H2	$55,71 \pm 0,78$ ^{Aa}	$52,54 \pm 1,48$ ^{Bb}	$51,38 \pm 1,07$ ^{bB}	$51,32 \pm 0,57$ ^{Bb}
H3	$54,71 \pm 1,10$ ^{Aa}	$55,79 \pm 0,37$ ^{Aa}	$55,22 \pm 2,30$ ^{aA}	$54,93 \pm 0,48$ ^{Aa}
ABTS (%)				
H0	$84,19 \pm 1,36$ ^{Aa}	$84,02 \pm 1,90$ ^{Aa}	$80,58 \pm 1,98$ ^{aA}	$70,04 \pm 5,61$ ^{Ba}
H1	$6,97 \pm 0,54$ ^{Bc}	$5,31 \pm 0,91$ ^{Bc}	$5,27 \pm 0,76$ ^{bB}	$17,72 \pm 1,59$ ^{Ab}
H2	$14,66 \pm 1,59$ ^{Ab}	$12,15 \pm 1,87$ ^{Ac}	$10,07 \pm 0,40$ ^{aB}	$12,96 \pm 1,05$ ^{Ab}
H3	$77,43 \pm 1,87$ ^{Aa}	$68,72 \pm 3,26$ ^{Bb}	$74,54 \pm 1,08$ ^{abA}	$67,31 \pm 5,16$ ^{Ba}

Os valores médios \pm desvio padrão que carregam sobrescritos diferentes nas colunas (letras minúsculas) e nas linhas (letras maiúsculas) diferem significativamente ($p < 0,05$). HFB: Caseinato bubalino hidrolisado com bromelina (4 h); HFP: hidrolisado com papaína (4 h); HFT: hidrolisado com tripsina (4 h); HFN: hidrolisado com neutrase (4 h) H0: hidrolisados inteiros; H1 com tamanho peptídico (PM) na faixa de >10 kDa; H2: fração com tamanho de peptídico (PM) na gama de 3-10 kDa e H3: fração com tamanho peptídico (PM) na faixa de ≤ 3 kDa.

Entre os grupos HFB, HFP, HFT e HFN, as maiores atividades foram registradas para os grupos HFB e HFN demonstrando maior potencial para obtenção de peptídeos capazes de eliminar o radical hidroxila.

Os resultados obtidos pelo presente estudo demonstram que o processo de ultrafiltração das frações com peptídeos menores apresentam maior eficácia antioxidante que o hidrolisado total *in vitro*. A nível intestinal, os peptídeos bioativos de menor porte podem atravessar a barreira do intestino sem que sofram hidrólise enzimática podendo apresentar atividade biológica no tecido (ZAIRESI et al., 2014; SHAZLY et al., 2017). Outro fator relevante é que o tipo de enzima utilizada afeta a atividade antioxidante dos peptídeos produzidos (ABDEL-HAMIND et al., 2017).

No grupo HFB, H0, H2 e H3 não influenciaram na atividade de eliminação do radical DPPH, diferente de H1 ($p > 0,05$), entretanto a capacidade de eliminação do radical dessas frações apresentou-se superior a H1. No grupo HFP as maiores atividades foram apresentadas no hidrolisado total e na fração <3 kDa ($56,93 \pm 0,28\%$ e $55,79 \pm 0,37\%$, respectivamente, os quais não apresentaram diferenças significativas entre si ($p < 0,05$).

O hidrolisado obtido pela ação da tripsina e neutrase e suas frações apresentaram maior atividade de eliminação do radical de $55,22 \pm 2,30\%$ e $54,93 \pm 0,48\%$, respectivamente, ambos na fração H3. Seguidas de H0, H2 e H1 para HFT e H1, H2 e H0 para HFN.

A variação na inibição do radical DPPH pode ser atribuída as diferenças na especificidade enzimática, em virtude da diferença na variação na eficácia de hidrólise da enzima e do ponto de clivagem para liberação de grupamentos funcionais (CUMBY et al., 2008; KUMAR et al., 2016). Resultados similares de atividade de eliminação de DPPH aos encontrados no presente estudo, foram observadas após os tratamentos com alta pressão hidrostática em isolados de proteína de soro, smoothies e amido (ANDRÉS; VILLANUEVA; TENORIO, 2016; ISKANDAR et al., 2015)

Com relação a atividade de eliminação do radical ABTS (tabela 1), nos grupos HFB e HFN, os maiores resultados foram observados para H0 ($84,19 \pm 1,36\%$ para bromelina e $70,04 \pm 5,61\%$ para neutrase) e H3 ($77,43 \pm 1,87\%$ para HFB e $67,31 \pm 5,16\%$), as quais não diferem estatisticamente ($p < 0,05$), enquanto a H1 e H2 registraram a menor atividade de eliminação de ABTS entre todas as frações para HFB e HFN, concomitantemente.

Nos hidrolisados e frações derivados da ação da papaína e tripsina as maiores atividades de eliminação de ABTS foi de $84,02 \pm 1,90\%$ e $80,58 \pm 1,98\%$, respectivamente, seguidas de H3, H1 e H2 diferindo significativamente entre si ($p < 0,05$). O maior potencial de eliminação do radical ABTS da fração contendo o hidrolisado total pode ser atribuído ao efeito sinérgico dos peptídeos de diferentes tamanhos presentes nas amostras (KUMAR et al., 2016).

Além disso, a ausência na diferença na atividade antioxidante indicada pela atividade de eliminação de radicais livres do ABTS que estar relacionada ao

tipo de tratamento e tempo de tratamento (HU et al., 2017), indica que as proteases empregadas no presente estudo clivam em pontos capazes de modificar as propriedades do caseinato original liberando peptídeos bioativos com capacidade de converter o radical ABTS em um produto incolor devido às propriedades de doação de hidrogênio ou quebra de cadeia (CORREA et al., 2011)

A capacidade de quelação de ferro dos hidrolisados derivados da caseína de búfala e suas frações apresentou-se superior a 70%, sendo os maiores valores observados para H3 ($77,53 \pm 0,26$ %), H2 ($76,51 \pm 0,11$ %), H3 ($78,81 \pm 2,16$ %) e H3 ($84,76 \pm 0,43$ %), obtidos pela ação de bromelina, papaína, tripsina e neutrase, respectivamente, diferindo a 95% de confiança (Tabela 2).

Tabela 2. Atividade quelante de ferro e cobre (%) dos hidrolisados do caseinato bubalino e suas frações obtidas a partir da hidrólise por diferentes proteases.

	HFB	HFP	HFT	HFN
	Quelante de Ferro (%)			
H0	$76,31 \pm 0,26$ ^{Aa}	$73,68 \pm 2,35$ ^{Ab}	$75,15 \pm 2,60$ ^{Aa}	$74,66 \pm 0,63$ ^{BCa}
H1	$75,25 \pm 0,69$ ^{Aa}	$76,30 \pm 0,35$ ^{Aab}	$76,16 \pm 0,20$ ^{Aa}	$75,94 \pm 1,20$ ^{Cab}
H2	$76,64 \pm 0,43$ ^{Aa}	$76,51 \pm 0,11$ ^{Aa}	$76,14 \pm 0,98$ ^{Aab}	$74,87 \pm 1,09$ ^{Ba}
H3	$77,53 \pm 0,26$ ^{BCa}	$75,70 \pm 1,47$ ^{Cab}	$78,81 \pm 2,16$ ^{Ab}	$84,76 \pm 0,43$ ^{Aa}
	Quelante de cobre (%)			
H0	$66,62 \pm 1,58$ ^{Aa}	$59,72 \pm 2,33$ ^{ABa}	$47,92 \pm 0,84$ ^{Bcb}	$38,23 \pm 1,44$ ^{Cb}
H1	$56,18 \pm 0,08$ ^{Aa}	$57,99 \pm 2,68$ ^{Aa}	$64,35 \pm 1,36$ ^{Aa}	$63,06 \pm 3,93$ ^{Aa}
H2	$62,79 \pm 1,13$ ^{Aa}	$60,75 \pm 2,27$ ^{Aa}	$53,58 \pm 0,79$ ^{Aab}	$61,64 \pm 1,59$ ^{Aa}
H3	$64,18 \pm 1,06$ ^{Aa}	$51,65 \pm 0,38$ ^{ABa}	$55,75 \pm 0,49$ ^{ABab}	$40,82 \pm 0,08$ ^{Bb}

Os valores médios \pm desvio padrão que carregam sobrescritos diferentes nas coluna (letras minúsculas) e nas linhas (letras maiúsculas) diferem significativamente ($p < 0,05$). HFB: Caseinato bubalino hidrolisado com bromelina (4 h); HFP: hidrolisado com papaína (4 h); HFT: hidrolisado com tripsina (4 h); HFN: hidrolisado com neutrase (4 h) H0: hidrolisados inteiros; H1 com tamanho peptídico (PM) na faixa de >10 kDa; H2: fração com tamanho de peptídico (PM) na gama de 3-10 kDa e H3: fração com tamanho peptídico (PM) na faixa de ≤ 3 kDa.

No que diz respeito a atividade quelante de cobre nota-se que para o grupo HFB não houve diferença significativa entre as frações ($p < 0,05$). Em relação aos grupos HFT e HFN os maiores valores para atividade de quelação de cobre foram observados para H1 ($64,35 \pm 1,36$ % e $63,06 \pm 3,93$ %, respectivamente) e os menores para H0 ($47,92 \pm 0,84$ e $38,23 \pm 1,44$, respectivamente) diferindo significativamente entre si ($p < 0,05$).

A quelação de metais de transição, como o ferro e cobre por exemplo, pode mitigar o dano oxidativo no organismo podendo atuar diminuindo a

peroxidação lipolítica, evitando as modificações nas características sensoriais de alimentos (ZHANG et al., 2010; SANCHEZ-VIOQUE et al., 2013). Diversas são as formas que os hidrolisados proteicos apresentam de se ligar aos íons metálicos (SOVAGO; OSZ, 2006), e segundo Saiga, Tanabe e Nishimura (2003), a capacidade de quelar metais tem efeito antioxidante devido ao fato dos metais de transição promoverem danos oxidativos em níveis diferentes, estando associadas a doenças degenerativas, quebra ou oxidação dos ácidos nucleicos (MANGEL et al., 2006; MEGIAS et al., 2007).

Os hidrolisados e as frações apresentaram atividade inibitória para inibição da α -glicosidase e da α -amilase; no entanto a inibição de α -glicosidase nos grupos obtidos pela ação da bromelina, papaína, tripsina e neutrase (Tabela 3), foram mais expressivas para H3 ($51,51 \pm 1,58\%$), H0 ($51,51 \pm 1,52\%$), H1;H2 ($54,54 \pm 0,00\%$) e H3 ($27,27 \pm 2,62$), respectivamente, diferindo estatisticamente ($p < 0,05$). A inibição de α -amilase foi superior para H2 (fração entre 3-10 kDa) para todos os tratamentos.

A inibição da atividade enzimática da α -amilase e α -glicosidase acarreta na diminuição ou atraso na digestão de carboidratos e subsequente absorção glicosídica, diminuindo a disponibilidade de glicose na corrente sanguínea, resultando na redução de glicemia pós-prandial em diabéticos (ALL, HOUGHTON; SOUMYANATH, 2006; JAN, KUMAR; JHA, 2016).

Em diversos trabalhos foi observado resultado semelhante ao do presente estudo Gludel et al. (2011) e Nongonoerma et al. (2013) relataram que hidrolisados proteicos derivados do soro de leite foram responsáveis pela supressão da α -glicosidase. Enquanto Konrad et al. (2014) observaram a inibição de α -glicosidase de *Saccharomyces cerevisiae* por frações de hidrolisados derivados do caseinato bovino empregando uma protease vegetal, sendo assim, existe uma relação entre a liberação ou presença de peptídeos bioativos a inibição enzimática (JAKUBOWICZ; FROY, 2013).

Tabela 3. Atividade antidiabética e anti-hipertensiva (%) dos hidrolisados do caseinato bubalino e suas frações obtidas a partir da hidrólise por diferentes enzimas proteolíticas.

	HFB	HFP	HFT	HFN
Inibitória de α -glicosidase (%)				
H0	36,36 \pm 0,00 ^{Bb}	51,51 \pm 1,52 ^{Aa}	42,42 \pm 1,51 ^{ABa}	0,00 \pm 0,00 ^{Cb}
H1	39,39 \pm 1,52 ^{Bab}	24,24 \pm 1,60 ^{Cb}	54,54 \pm 0,00 ^{Aa}	0,00 \pm 0,00 ^{Db}
H2	42,42 \pm 1,51 ^{Aab}	9,09 \pm 0,00 ^{Bc}	54,54 \pm 0,00 ^{Aa}	0,00 \pm 3,03 ^{Bb}
H3	51,51 \pm 1,58 ^{Aa}	9,09 \pm 0,00 ^{Bc}	45,45 \pm 0,00 ^{Aa}	27,27 \pm 2,62 ^{Ba}
Inibitória de α -amilase (%)				
H0	73,58 \pm 0,00 ^{Ab}	56,70 \pm 0,77 ^{Bb}	44,74 \pm 1,24 ^{Cd}	75,58 \pm 0,24 ^{Aa}
H1	76,67 \pm 0,00 ^{Aa}	53,33 \pm 1,56 ^{Cc}	60,00 \pm 1,14 ^{Bc}	75,44 \pm 0,00 ^{Aa}
H2	75,44 \pm 0,00 ^{Aab}	67,69 \pm 0,43 ^{Ba}	68,42 \pm 0,40 ^{Ba}	77,42 \pm 0,00 ^{Aa}
H3	69,56 \pm 0,00 ^{Bc}	39,13 \pm 2,65 ^{Db}	65,85 \pm 0,83 ^{Cb}	76,67 \pm 0,00 ^{Aa}
Inibição da enzima conversora de angiotensina ECA (%)				
H0	62,66 \pm 3,71 ^{aB}	44,00 \pm 0,14 ^{Bb}	39,35 \pm 0,38 ^{cC}	39,92 \pm 0,57 ^{cC}
H1	46,53 \pm 4,99 ^{aC}	40,82 \pm 0,99 ^{Aa}	41,44 \pm 0,00 ^{aB}	41,25 \pm 0,47 ^{aB}
H2	48,24 \pm 1,94 ^{aC}	42,25 \pm 0,42 ^{Aa}	43,44 \pm 0,00 ^{aB}	42,49 \pm 0,85 ^{aB}
H3	80,23 \pm 3,05 ^{aA}	45,00 \pm 1,14 ^{Ca}	61,08 \pm 2,59 ^{bA}	84,08 \pm 1,97

Os valores médios \pm desvio padrão que carregam sobrescritos diferentes nas colunas (letras minúsculas) e nas linhas (letras maiúsculas) diferem significativamente ($p < 0,05$). HFB: Caseinato bubalino hidrolisado com bromelina (4 h); HFP: hidrolisado com papaína (4 h); HFT: hidrolisado com tripsina (4 h); HFN: hidrolisado com neutrase (4 h) H0: hidrolisados inteiros; H1 com tamanho peptídico (PM) na faixa de >10 kDa; H2: fração com tamanho de peptídico (PM) na gama de 3-10 kDa e H3: fração com tamanho peptídico (PM) na faixa de ≤ 3 kDa.

O potencial inibitório da ECA foi observado em todas as frações e no hidrolisado total, apresentando atividades entre $39,35 \pm 0,38$ e $84,08 \pm 1,97\%$. A atividade de inibição da enzima conversora de angiotensina I (ECA) apresentou atividade significativa ($p < 0,05$) maior na fração H3 (≤ 3 kDa) de todos os grupos enzimáticos avaliados, sendo esse potencial de $80,23 \pm 3,05$ para HFB, $45,00 \pm 1,14$ para HFP, $61,08 \pm 2,59$ para HFT e $84,08 \pm 1,97\%$ para HFN. Em relação aos resultados obtidos entre os tratamentos enzimáticos, a bromelina foi capaz de produzir hidrolisados e frações com a atividade de inibição de ECA superiores, e seguidas pela neutrase, tripsina e papaína, sendo diferentes estatisticamente entre si.

Esperjo-carpio et al (2013) obtiveram entre 30 e 65% de inibição da enzima conversora de angiotensina ao submeter a caseína e as proteínas do soro de leite de cabra a ação individual e simultânea das enzimas subtilina e tripsina. Resultados semelhantes foram encontrados por Luo et al (2014) que ao hidrolisar a caseína pela ação proteolítica de três enzimas obtiveram inibição de ECA máxima de 65%.

Os resultados encontrados no presente estudo são comparáveis à atividade anti-hipertensiva encontrada em hidrolisados derivados da caseína e do ovo obtidos por meio de hidrólise enzimática ou por fermentação Miguel et al., (2004), Muguerza et al. (2006) Contreras et al (2009).

Com relação a atividade antimicrobiana, a eficácia dos hidrolisados e frações peptídicas obtidos pela hidrólise enzimática da bromelina (HFB), papaína (HFP), tripsina (HFT) e Neutrase (HFN) apresentou-se entre $3,28 \pm 0,43$ e 100% de inibição contra bactérias gram-positivas (*Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*) e gram-negativas (*Escherichia coli* e *Salmonella sp.*), (tabela 4).

Tabela 4. Atividade antibacteriana (%) dos hidrolisados do caseinato bubalino e suas frações obtidas a partir da hidrólise por diferentes enzimas proteolíticas.

	HFB	HFP	HFT	HFN
<i>E. coli</i>				
H0	79,49 ± 2,42 ^{Aa}	45,50 ± 0,69 ^{Bab}	48,87 ± 4,37 ^{bC}	45,07 ± 1,21 ^{Bc}
H1	67,52 ± 0,74 ^{Ab}	44,29 ± 0,52 ^{Cab}	59,92 ± 1,85 ^{bcB}	57,27 ± 0,43 ^{Bb}
H2	57,32 ± 1,60 ^{Bc}	41,05 ± 2,55 ^{Cb}	80,45 ± 0,12 ^{aA}	78,24 ± 1,08 ^{Aa}
H3	47,32 ± 2,59 ^{Bd}	51,34 ± 7,76 ^{Bb}	83,77 ± 1,22 ^{aA}	76,96 ± 6,76 ^{Aa}
<i>L. monocytogenes</i>				
H0	48,05 ± 2,90 ^{Bb}	62,22 ± 6,05 ^{Bc}	55,28 ± 4,04 ^{abC}	43,44 ± 0,47 ^{Bc}
H1	52,38 ± 1,90 ^{Bb}	63,93 ± 0,95 ^{Ac}	61,60 ± 3,04 ^{acb}	36,17 ± 0,80 ^{aC}
H2	63,21 ± 6,05 ^{Ba}	75,43 ± 2,14 ^{Ab}	68,73 ± 1,71 ^{abB}	26,95 ± 0,90 ^{aB}
H3	62,93 ± 0,95 ^{Ba}	100,00 ± 4,94 ^{Aa}	92,73 ± 0,33 ^{aC}	3,28 ± 0,43 ^{aC}
<i>Salmonella sp.</i>				
H0	52,00 ± 1,90 ^{Bc}	49,38 ± 2,04 ^{Cc}	56,61 ± 1,19 ^{aD}	69,30 ± 1,18 ^{cD}
H1	54,52 ± 2,61 ^{Cb}	50,95 ± 1,14 ^{Dc}	66,44 ± 0,10 ^{aC}	40,54 ± 0,43 ^{bC}
H2	54,90 ± 1,85 ^{Cb}	53,75 ± 2,71 ^{Cb}	82,60 ± 0,00 ^{aB}	20,96 ± 0,43 ^{bB}
H3	63,12 ± 0,00 ^{Ca}	63,17 ± 1,28 ^{Ca}	99,29 ± 0,62 ^{aA}	10,74 ± 0,48 ^{bA}
<i>Staphylococcus aureus</i>				
H0	51,28 ± 1,76 ^{Ad}	46,72 ± 1,47 ^{abD}	42,39 ± 1,71 ^{bC}	55,75 ± 0,24 ^{bC}
H1	60,55 ± 4,64 ^{Ac}	55,09 ± 0,33 ^{Bc}	47,43 ± 0,67 ^{cC}	49,29 ± 0,43 ^{bB}
H2	68,54 ± 3,76 ^{Bb}	91,87 ± 2,14 ^{aB}	55,37 ± 0,52 ^{cB}	49,57 ± 0,33 ^{cB}
H3	100,00 ± 0,00 ^{Aa}	84,65 ± 5,81 ^{bA}	75,00 ± 2,47 ^{cA}	11,36 ± 0,62 ^{bB}

Os valores médios ± desvio padrão que carregam sobrescritos diferentes nas colunas (letras minúsculas) e nas linhas (letras maiúsculas) diferem significativamente ($p < 0,05$). HFB: Caseinato bubalino hidrolisado com bromelina (4 h); HFP: hidrolisado com papaína (4 h); HFT: hidrolisado com tripsina (4 h); HFN: hidrolisado com neutrase (4 h) H0: hidrolisados inteiros; H1 com tamanho peptídico (PM) na faixa de >10 kDa; H2: fração com tamanho de peptídico (PM) na gama de 3-10 kDa e H3: fração com tamanho peptídico (PM) na faixa de ≤ 3 kDa.

Escherichia coli é a bactéria contaminante mais comum na cadeia alimentar (KUMAR et al. 2016), no presente estudo, entre as frações do grupo HFB, a maior atividade antibacteriana contra esse micro-organismo foi

observada para o hidrolisado total H0 ($79,49 \pm 2,42\%$), diferindo das demais frações ($p > 0,05$). Nos grupos HFP e HFT a fração H3 registrou maior potencial de inibição de *E. coli*, enquanto que no grupo HFN a maior atividade foi registrada na fração H2 ($78,24 \pm 1,08\%$) sendo comparável a H3 ($76,96 \pm 6,76$) e diferente das demais frações. De modo geral, entre os grupos as maiores atividades foram observadas para o tratamento contendo tripsina sendo igual aos grupos HFB e HFN apresentando efeito diferente apenas em relação ao tratamento com a enzima vegetal, a papaína que apresenta menor especificidade sobre o caseinato bubalino (ABDEL-HAMID et al., 2017) que as demais enzimas proteolíticas analisadas.

Peptídeos que apresentam massa molecular menor apresentam maior atividade antibacteriana quando comparados a peptídeos de alta massa (ABDEL-HAMID et al, 2016). Resultados semelhantes ao presente estudo também foram encontrados por Salami et al. (2010) que ao trabalhar com hidrolisados da proteína de soro de camelo relataram que o permeado de ultrafiltrados (3 kDa) tinha a maior atividade antibacteriana contra *E. coli*.

A atividade anti-listeria das frações H3 dos grupos sob ação proteolítica da bromelina ($62,93 \pm 0,95\%$), papaína ($100 \pm 4,94\%$) e tripsina ($92,73 \pm 0,33\%$) exibiram, significativamente ($p < 0,05$), maior atividade em relação as demais frações. No grupo hidrolisado pela neutrase observou-se que o hidrolisado total (H0) apresentou maior capacidade inibitória para *L. monocytogenes* em relação as frações H1, H2 e H3. Na comparação geral entre os grupos, HFT e HFP exibiram maiores potenciais de inibição sendo estatisticamente iguais, seguido pelo grupo HFB e HFN, que diferem estatisticamente entre si e em relação aos demais.

A atividade antimicrobiana contra *Salmonella sp.* foi maior para o hidrolisado total de caseína produzido pela neutrase ($69,30 \pm 1,18\%$), as demais frações tiveram sua atividade reduzida com a diminuição no tamanho dos peptídeos. Em relação aos hidrolisados de caseinato produzidas pela ação da bromelina, tripsina e papaína, a fração H3 ($63,12 \pm 0,00\%$, $99,29 \pm 0,62\%$, $63,17 \pm 1,28\%$, respectivamente) destes grupos exibiu maior atividade inibitória significativa ($p < 0,05$) seguidas de $H2 > H1 > H0$ sendo diferentes entre si. Em

relação aos grupos, de modo geral, o grupo HFT apresentou maior potencial de inibição, seguido pelo grupo HFN, HFB e HFP, sendo os dois últimos comparáveis entre si e diferentes dos demais.

Os resultados do teste de atividade antibacteriana dos hidrolisados e frações contra *Staphylococcus aureus* seguiu uma tendência semelhante àquela encontrada para a atividade anti-salmonela e anti-listeria. A fração H3 dos grupos HFB, HFP e HFT sendo comparáveis entre si e difere das demais, com atividade inibitória de $100,00 \pm 0,00\%$, $84,65 \pm 5,81\%$ e $75,00 \pm 2,47\%$, respectivamente. Em relação aos grupos enzimáticos, o grupo hidrolisado por bromelina apresentou o maior potencial médio sendo igual a papaína, seguidas pelos grupos sob ação da neutrase e tripsina, que apresentaram menor potencial significativo igual ($p < 0,05$).

Os resultados no presente achado corroboram com os descritos por Demers-Mathieu et al. (2013) que ao comparar o nanofiltrado, o permeado e o retido de hidrolisado trípico de soro de leite bovino com 49, 38 e 97% de inibição, respectivamente, observaram que o retido da nanofiltração apresentou mais potencial antimicrobiano contra *Listeria* sp., *S. aureus* e a *E.coli*.

No presente estudo, é possível observar um maior potencial antibacteriano nos ultrafiltrados em relação aos hidrolisados totais, sobretudo da fração H3. Segundo Osman et al. 2016, a presença de peptídeos médios e pequenos pode acarretar em um maior potencial antimicrobiano, em contrapartida, a mistura de peptídeos de diferentes pesos (H0) pode significar menor atividade antimicrobiana quando não há sinergismo entre as frações peptídicas.

Esse efeito sinérgico, a presença ou ausência na intencidade do potencial antibacteriano depende, principalmente da interação entre os peptídeos antimicrobianos e a parede celular bacteriana, ou seja, sugere que peptídeos carregados negativamente tenham maior afinidade por membranas carregadas positivamente (HANCOCK, 2004; GLINEL, THEBAULT, HUMBLLOT, PRADIER; JOUENNE, 2012).

4. Conclusão

Os hidrolisados totais e frações peptídicas (>10 kDa - H1; $3 \geq n \leq 10$ kDa- H2; ≤ 3 kDa- H3) obtidos pela ação proteolítica da bromelina, papaína, tripsina e neutrase sobre o leite bubalino foram capazes de eliminar radicais livres, quelar ferro e cobre, bem como apresentaram atividade antidiabética, anti-hipertensiva e antibacteriana. Por conseguinte, a fração de menor massa molecular (≤ 3 kDa) exibiu maior potencial biológico o que demonstra a eficácia da técnica de ultrafiltração para obtenção de grupos peptídicos com diferentes massas moleculares. Entre as enzimas a bromelina demonstrou mais aptidão na hidrólise enzimática do caseinato bubalino originando hidrolisados e frações peptídicas com diversas atividades biológicas. A potencialidade biológica exibida pelos hidrolisados e frações obtidas a partir da hidrólise do caseinato de búfala demonstra uma aplicação em potencial como alimentos funcionais ou nutracêuticos.

Referências

ABDEL-HAMID, M. et al. Antibacterial activity of papain hydrolysed camel whey and its fractions. **International Dairy Journal**, v. 61, p. 91-98, 2016.

ABDEL-HAMID, M. et al. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity and antioxidant capacity of bioactive peptides derived from enzymatic hydrolysis of buffalo milk proteins. **International Dairy Journal**, v. 66, p. 91-98, 2017.

ALI, H.; HOUGHTON, P. J.; SOUMYANATH, A. α -Amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, n. 3, p. 449-455, 2006.

BAMDAD, F. et al. Anti-Inflammatory and antioxidant properties of casein hydrolysate produced using high hydrostatic pressure combined with proteolytic enzymes. **Molecules**, v. 22, n. 4, p. 609, 2017.

CUMBY, N. et al. Antioxidant activity and water-holding capacity of canola protein hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 109, n. 1, p. 144-148, 2008.

CORRÊA, A. P. F. et al. Antioxidant, antihypertensive and antimicrobial properties of ovine milk caseinate hydrolyzed with a microbial protease. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 12, p. 2247-2254, 2011.

CUSHMAN, D. W.; CHEUNG, H. S. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. **Biochemical Pharmacology**, v. 20, n. 7, p. 1637-1648, 1971.

DEMERS-MATHIEU, V. et al. Antibacterial activity of peptides extracted from tryptic hydrolyzate of whey protein by nanofiltration. **International Dairy Journal**, v. 28, n. 2, p. 94-101, 2013.

DUAN, X. et al. Evaluation of antioxidant property of extract and fractions obtained from a red alga, *Polysiphonia urceolata*. **Food Chemistry**, v. 95, n. 1, p. 37-43, 2006.

EGITO, A. S. et al. Milk-clotting activity of enzyme extracts from sunflower and albizia seeds and specific hydrolysis of bovine κ -casein. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 7, p. 816-825, 2007.

EL-SALAM, Mohamed H. Abd; EL-SHIBINY, Safinaz. A comprehensive review on the composition and properties of buffalo milk. **Dairy Science & Technology**, v. 91, n. 6, p. 663, 2011.

ESPEJO-CARPIO, F. J. et al. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of enzymatic hydrolysates of goat milk protein fractions. **International Dairy Journal**, v. 32, p. 175-183. 2013.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO), WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Production and Dairy Products**: FAO; 2017. Disponível em: <<http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/milk-production/dairy-animals/water-buffaloes/en/#.Wam2rsiGPIV>>. Acesso em: 01 set. 2017

FOSGERAU, K.; HOFFMANN, T. Peptide therapeutics: current status and future directions. **Drug Discovery Today**, v. 20, n. 1, p. 122-128, 2015.

ANDRÉS, V.; VILLANUEVA, M. J.; TENORIO, M. D. The effect of high-pressure processing on colour, bioactive compounds, and antioxidant activity in smoothies during refrigerated storage. **Food chemistry**, v. 192, p. 328-335, 2016.

GAUDEL, C. et al. A whey protein hydrolysate promotes insulinotropic activity in a clonal pancreatic β -cell line and enhances glycemic function in ob/ob mice. **The Journal of Nutrition**, v. 143, n. 7, p. 1109-1114, 2013.

GLINEL, K. et al. Antibacterial surfaces developed from bio-inspired approaches. **Acta biomaterialia**, v. 8, n. 5, p. 1670-1684, 2012.

HERNÁNDEZ-LEDESMA. et al. Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from a-lactalbumin and b-lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.588–593, 2005.

HU, G. et al. Effects of high hydrostatic pressure, ultraviolet light-C, and far-infrared treatments on the digestibility, antioxidant and antihypertensive activity of α -casein. **Food chemistry**, v. 221, p. 1860-1866, 2017.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. The world dairy situation 2014. Bulletin No. 476/2014. International Dairy Federation (IDF), Brussels, Belgium.

ISKANDAR, M. M. et al. High hydrostatic pressure pretreatment of whey protein isolates improves their digestibility and antioxidant capacity. **Foods**, v. 4, n. 2, p. 184-207, 2015.

ISLAM, M. A. et al. Principal milk components in buffalo, holstein cross, indigenous cattle and Red Chittagong Cattle from Bangladesh. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 27, n. 6, p. 886, 2014.

JAKUBOWICZ, D.; FROY, O. Biochemical and metabolic mechanisms by which dietary whey protein may combat obesity and Type 2 diabetes. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 1, p. 1-5, 2013.

JAN, F.; KUMAR, S.; JHA, R. Effect of boiling on the antidiabetic property of enzyme treated sheep milk casein. **Veterinary World**, v. 9, n. 10, p. 1152, 2016.

LUO, Y. et al. Physical, chemical and biochemical properties of casein hydrolyzed by three proteases: Partial characterizations. **Food Chemistry**, v. 155, p. 146-154. 2014

KIM, Y.M.; WANG, M.H.; RHEE, H.I. A novel alpha-glucosidase inhibitor from pine bark, **Carbohydrate Research**, v.339, n.3, p.715-717, 2014.

KONRAD, B. et al. The evaluation of dipeptidyl peptidase (DPP)-IV, α -glucosidase and angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory activities of whey proteins hydrolyzed with serine protease isolated from Asian pumpkin (*Cucurbita ficifolia*). **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 20, n. 4, p. 483-491, 2014.

KUMAR, D. et al. Enzymatic hydrolysis of camel milk casein and its antioxidant properties. **Dairy Science & Technology**, v. 96, n. 3, p. 391-404, 2016a.

KUMAR, D. et al. Antioxidant and antimicrobial activity of camel milk casein hydrolysates and its fractions. **Small Ruminant Research**, v. 139, p. 20-25, 2016b.

MANDEL, S. et al. Green tea catechins as brain-permeable, natural iron chelators-antioxidants for the treatment of neurodegenerative disorders. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 50, n. 2, p. 229-234, 2006.

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. **The FEBS Journal**, v. 47, n. 3, p. 469-474, 1974.

MEGÍAS, C. et al. Affinity purification of copper chelating peptides from chickpea protein hydrolysates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 10, p. 3949-3954, 2007.

NIELSEN, S. D. et al. Milk bioactive peptide database: A comprehensive database of milk protein-derived bioactive peptides and novel visualization. **Food Chemistry**, v. 232, p. 673-682, 2017.

NONGONIERMA, A. B. et al. Insulinotropic properties of whey protein hydrolysates and impact of peptide fractionation on insulinotropic response. **International Dairy Journal**, v. 32, n. 2, p. 163-168, 2013.

HANCOCK, Robert EW. Bacterial structure and physiology: Influence on susceptibility to cationic. **Mammalian host defense peptides**, v. 6, p. 44, 2004.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICEEVANS, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 1231-1237, 1999.

SAIGA, A. I.; TANABE, S.; NISHIMURA, T. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 12, p. 3661-3667, 2003.

SAINI, P. et al. Process optimization for preparation of caseinophosphopeptides from Buffalo milk casein and their characterization. **Journal of Dairy Research**, v.81, p. 364-37, 2014.

SALAMI, M. et al. Improvement of the antimicrobial and antioxidant activities of camel and bovine whey proteins by limited proteolysis. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 58, n. 6, p. 3297-3302, 2010.

MUGUERZA, B. et al. Antihypertensive activity of milk fermented by *Enterococcus faecalis* strains isolated from raw milk. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 1, p. 61-69, 2006.

CONTRERAS, María et al. Novel casein-derived peptides with antihypertensive activity. **International Dairy Journal**, v. 19, n. 10, p. 566-573, 2009.

MIGUEL, M. et al. Angiotensin I–converting enzyme inhibitory activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. **Journal of food protection**, v. 67, n. 9, p. 1914-1920, 2004.

SÁNCHEZ-VIOQUE, R. et al. In vitro antioxidant and metal chelating properties of corm, tepal and leaf from saffron (*Crocus sativus* L.). **Industrial Crops and Products**, v. 39, p. 149-153, 2012.

SÁNCHEZ-VIOQUE, R. et al. Polyphenol composition and antioxidant and metal chelating activities of the solid residues from the essential oil industry. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 150-159, 2013.

SHANMUGAM, V. P. et al. Antioxidative peptide derived from enzymatic digestion of buffalo casein. **International Dairy Journal**, v. 42, p. 1-5, 2015.

SHAZLY, A.B. et al. Fractionation and identification of novel antioxidant peptides from buffalo and bovine casein hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 232, p. 753-762, 2017.

SÓVÁGÓ, I; ÓSZ, K. Metal ion selectivity of oligopeptides. **Dalton Transactions**, n. 32, p. 3841-3854, 2006.

OSMAN, A. et al. Antibacterial peptides generated by Alcalase hydrolysis of goat whey. **LWT-Food Science and Technology**, v. 65, p. 480-486, 2016.

WU, S.; QI, W.; LI, T.; LU, D.; SU, R.; HE, Z. Simultaneous production of multifunctional peptides by pancreatic hydrolysis of bovine casein in an enzymatic membrane reactor via combinational chromatography. **Food Chemistry**, v. 141, p. 2944-2951, 2013.

YEN, G.C.; CHEN, H.Y. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.43, 27-37, 1995.

ZAREI, M. et al. Identification and characterization of papain-generated antioxidant peptides from palm kernel cake proteins. **Food Research International**, v. 62, p. 726-734, 2014.

ZHANG, L. et al. Inhibitory effect of raspberries on starch digestive enzyme and their antioxidant properties and phenolic composition. **Food Chemistry**, v. 119, n. 2, p. 592-599, 2010.

ZHU, K.X.; ZHOU, H.M.; QIAN, H.F. Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. **Process Biochemistry**. v.41, p.1296–1302, 2006.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A proposta de empregar diferentes caseinatos (bovino, bubalino e caprino) sob ação proteolítica da bromelina, papaína, tripsina e neutrase em diferentes tempos de hidrólise é atrativa e viável sob o ponto de vista biotecnológico, sobretudo pela susceptibilidade a hidrólise pela ação dessas proteases.
- Os hidrolisados proteicos obtidos pela ação proteolítica das quatro enzimas sobre os três caseinatos apresentaram atividade antioxidante em relação a eliminação dos radicais dos radicais ABTS (2,2'- azinobis-3-etilbenzoti azolina- 6-ácido sulfônico), DPPH (2,2-Diphenil-1-picrilidrasil), superóxido, hidroxila e quelação de ferro e cobre.
- O hidrolisado oriundo do caseinato bubalino submetido a ação das quatro enzimas proteolíticas sob o tempo de 240 minutos apresentou, em termos gerais, a maior capacidade multifuncional.
- A técnica de ultrafiltração mostrou-se viável biotecnologicamente na obtenção de frações peptídicas capazes de sequestrar e eliminar radicais livres, quelar metais, inibir a ação de enzimas responsáveis pelo aparecimento da diabetes e hipertensão, além disso as frações oriundas dos hidrolisados apresentam capacidade de inibir parcial e totalmente o crescimento de bactérias gram-negativas e gram-positivas
- A partir da caracterização mais profunda dos hidrolisados (segurança alimentar e identificação) é possível aplicar nas indústrias alimentícia e farmacêutica.

APÊNDICE

**“MÉTODO PARA OBTENÇÃO DE HIDROLISADOS PROTEICOS
ANTIOXIDANTES OBTIDOS A PARTIR DA CASEÍNA DO LEITE
BUBALINO”**

Patente depositada no:



Data de depósito: 18 de agosto de
2017

Nº do Processo: BR 10 2017 017733
5

Dados do Depositante

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24416174000106

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: AVENIDA DOM MANOEL DE MEDEIROS, S/N

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 52171-900

País: Brasil

Telefone: (81) 33206104

Fax: (81) 33206001

Email: coordenacao.nit@ufrpe.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): MÉTODO PARA OBTENÇÃO DE HIDROLISADOS PROTEICOS ANTIOXIDANTES OBTIDOS A PARTIR DA CASEÍNA DO LEITE BUBALINO

Resumo: “MÉTODO PARA OBTENÇÃO DE HIDROLISADOS PROTEICOS ANTIOXIDANTES OBTIDOS A PARTIR DA CASEÍNA DO LEITE BUBALINO”. Esta invenção descreve um método de obtenção de hidrolisados proteicos multifuncionais oriundos do caseinato bubalino submetidos a proteólise empregando bromelina, papaína, tripsina e protease neutra. Tendo esses hidrolisados proteicos apresentando potencial biológico em relação à capacidade antioxidante de eliminação de DPPH, ABTS, superóxido e hidroxila, bem como de quelar os íons ferro e cobre in vitro com potencial aplicação na indústria alimentícia e farmacêutica, alimento funcional, suplemento alimentar ou desenvolvimento de fármaco, respectivamente.

Inventor 1 de 5

Nome: WELLINGTON LEAL DOS SANTOS
CPF: 10135993490
Nacionalidade: Brasileira
Qualificação Física: Mestrando
Endereço: av Julia Brasileiro, Vila Nova, 201, Lagoa do Ouro, Boa Vista
Cidade: Lagoa do Ouro
Estado: PE
CEP: 55292-748
País: BRASIL
Telefone: (87) 996 344449
Fax:
Email: wellingtonleal@gmail.com

Inventor 2 de 5

Nome: MARIA DO BOM CONSELHO LACERDA MEDEIROS
CPF: 00760330239
Nacionalidade: Brasileira
Qualificação Física: Mestrando
Endereço: Rua do Ipiranga,177, Boa Vista
Cidade: Garanhuns
Estado: PE
CEP: 55300-999
País: BRASIL
Telefone: (87) 996123556
Fax:
Email: melryagronomia@hotmail.com

Inventor 3 de 5

Nome: JOAO TIAGO CORREIA OLIVEIRA
CPF: 06646363498
Nacionalidade: Brasileira
Qualificação Física: Doutorando
Endereço: Rua Quintino Bocaiuva, 526, Centro
Cidade: Correntes
Estado: PE
CEP: 55315-000
País: BRASIL
Telefone: (87) 999113295
Fax:
Email: joaotiago@zootecnista.com.br

Inventor 4 de 5

Nome: THAILAN ARLINDO DA SILVA
CPF: 10972202498
Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Graduação
Endereço: Rua Joaquim Timoteo de Andrade, Planalto
Cidade: Taquaritinga do Norte
Estado: PE
CEP:
País: BRASIL
Telefone: (87) 999725323
Fax:
Email: thailanarlindo590@gmail.com

Inventor 5 de 5

Nome: KEILA APARECIDA MOREIRA
CPF: 56956991187
Nacionalidade: Brasileira
Qualificação Física: Professor do ensino superior
Endereço: Sitio Tamboril, CX- 260, Zona Rural
Cidade: Garanhuns
Estado: PE
CEP: 55293-970
País: BRASIL
Telefone: (87) 996094715
Fax:
Email: moreirakeila@hotmail.com

“MÉTODO PARA OBTENÇÃO DE HIDROLISADOS PROTEICOS ANTIOXIDANTES OBTIDOS A PARTIR DA CASEÍNA DO LEITE BUBALINO”

RELATÓRIO DESCRITIVO

Campo da Invenção

[001] Esta invenção se insere no campo da biotecnologia, mais especificamente, a tecnologia se refere ao método de obtenção de hidrolisados proteicos com potencial biológico obtidos a partir da hidrólise enzimática da caseína do leite bubalino. Estes hidrolisados podem ser empregados na indústria alimentícia como alimento funcional na mitigação de patologias crônicas e nutracêutico podendo ser utilizado de forma natural ou como ingrediente associado a um alimento natural, além disso, pode ser empregado como substituto aos antioxidantes sintéticos.

Antecedentes da Invenção

[002] Atualmente os consumidores tem buscado alimentos benéficos a sua saúde regulando as mais diversas atividades metabólicas no organismo. Alimentos que apresentam benefícios a saúde são chamados de alimentos funcionais, tendo despertado o interesse dos mais diversos setores industriais principalmente, a indústria farmacêutica e/ou indústria de alimentos, devido ao fato desses alimentos serem fontes de componentes que apresentam potencial biológico capazes de mitigar diversas patologias.

[003] Dentre esses compostos/componentes biológicos naturais, destacam-se os hidrolisados proteicos que são ricos em peptídeos bioativos, pequenos fragmentos proteicos normalmente entre 2 e 20 aminoácidos, assim chamados porque são capazes de atuar regulando funções bioquímicas e fisiológicas no organismo animal seja participando diretamente ou induzindo-as.

[004] O potencial biológico de peptídeos bioativos presentes em hidrolisados proteicos oriundos da hidrólise da proteína do leite reside no potencial de carrear ou quelar íons metálicos e eliminação de radicais livres associada a atividade antioxidante desses compostos.

[005] Os documentos do estado da técnica no âmbito patentário fazem referência a obtenção de líquido peptídico e proteínas fosforiladas capazes de quelar ferro e demais funcionalidades, apresentando diferenças quanto ao uso e aplicação da tecnologia descrita na presente invenção.

[006] No documento CN101731628 B primeiramente prepara-se a suspensão da caseína em água deionizada, posteriormente adiciona-se a protease na suspensão de caseína para obter líquido enzimático. Adicionando ácido no líquido enzimático filtrado e ajustando o valor do pH de 2 a 7. Cerca de 1/3 a 2/3 de líquido enzimático na água deionizada ou água destilada e adicionando sulfato ferroso ou cloreto ferroso, em seguida, adicionando a enzima para realizar a reação de quelação. Obtendo o ferro quelado de peptídeos de caseína após secar e purificar o líquido de reação. Diferentemente, a presente invenção utiliza proteases comerciais para obter hidrolisados ricos em peptídeos capazes de quelar não apenas o íon ferro, como também o íon cobre, sequestro de radicais hidroxila, superóxido, ABTS e DPPH, caracterizando o hidrolisado como multifuncional.

[007] No documento CN 105230965 A, é descrita a preparação de proteína fosforilada de alta capacidade de quelatos através de ondas sonoras. Inicialmente ocorre a dispersão de proteínas da ervilha em água, de modo a formar o líquido de suspensão da qual a concentração de massa é 5-8%. Adiciona-se solução de hidróxido de sódio ao líquido de suspensão e ajustando o pH para 7,5-8,5, depois adiciona-se a solução de tripolifosfato de sódio, cuja concentração de massa é 1-3%, agitando até a uniformidade. Em seguida, realizando um tratamento de 15 a 30 minutos através de ondas ultra-sônicas, das quais a frequência é de 20-25 KHz e o potência de 200W para a realização de uma reação de fosforilação, ajustando o valor de pH do líquido da amostra após a reação de fosforilação para 4,0, realizando a centrifugação por 25- 35 min a 4000rotação por minuto. Posteriormente, lavando o sedimento duas vezes com água destilada e liofilizando o sedimento lavado de modo a obter a proteína fosforilada. O método descrito difere do método desta invençãoda preparação de proteína fosforilada de alta capacidade de quelação que utiliza ondas ultrassônicas pois realizahidrólise enzimática empregando quatro proteases com

diferentes sítios catalíticos em diferentes pH, temperaturas e tempo de hidrólise o que garante uma maior homogeneidade na amostra.

[008] O documento WO 1995027485 A1 descreve o método para reduzir o dano de radicais livres em mamíferos compreendendo administrar a um mamífero uma quantidade segura e eficaz de um composto selecionado de 1-fenil-1,2-propanodiona-2-oxima, benzoilacetona, piroctona, 2-furildioxima, 2-furilmonoxima, ácido dietotildi-hidrocarboneto, deferoxamina e 1,2-dimetil-3-hidroxi-piridona, ou um sal farmacologicamente aceitável, ou misturas dos compostos em questão, e/ou dos seus sais. Diferentemente da presente invenção, que utiliza um composto natural para obtenção dos hidrolisados que desempenham função de reduzir os radicais livres.

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

Descrição da Invenção

[010] O caseinato de sódio da espécie bubalina foi oriundo de leite desnatado por centrifugação, logo depois precipitado empregando um ácido forte, preferencialmente ácido clorídrico, no ponto isoelétrico da caseína do leite e novamente centrifugado. Em seguida, o precipitado lavado e solubilizado em água destilada ajustando-se para um pH neutro empregando uma base forte, preferencialmente hidróxido de sódio. O ciclo precipitação/solubilização repetido três vezes, findando com a lavagem empregando água destilada, ajustando o pH para neutro empregando uma base forte, compreendendo o hidróxido de sódio e dialisada contra água deionizada a baixa temperatura.

[011] Para a preparação dos hidrolisados de caseinato bubalino foram empregadas proteases comerciais. Para a produção dos hidrolisados proteicos, o caseinato foi solubilizado em tampão tendendo de levemente ácido a levemente alcalino com pH e temperatura ajustados de acordo com a atividade ótima de cada enzima, bromelina, papaína, tripsina e protease neutra, com relação enzima:substrato de 1:100 v/v. A hidrólise ocorreu por 8 horas tendo avaliações nos tempos 30, 60, 120, 240, 360 e 480 minutos. A reação hidrolítica foi interrompida por aquecimento até à fervura em tempo maior que 10 minutos.

Exemplo 1: Caracterização do potencial antioxidante dos hidrolisados proteicos obtidos pela hidrólise enzimática empregando bromelina, papaína, protease neutra e tripsina

[012] Para determinação do grau de hidrólise o teor de aminoácidos foi determinado empregando solução de TNBS a 0,01M (Benjakul e Morrissey, J. Agric. Food Chem., 45:3423–3430, 1997).

[013] Os ensaios de determinação da eliminação do radical hidroxila *in vitro* foi determinado misturando a amostra contendo os hidrolisados, 1,10-fenantrolina (5,0 mM), FeSO₄ (5,0 mM), de EDTA (15 mM) e solução tampão ligeiramente alcalina (Zhu et al., Process Biochem., 41:1296–1302, 2006). A atividade de eliminação do radical superóxido foi determinada utilizando amostras hidrolisadas, misturadas com tampão Tris-HCl-EDTA 50 mM (1mM, pH 8,2) e pirogalol 1,5 mM de acordo com a metodologia descrita por Marklund e Marlund (FEBS J., 47(3):469-474, 1974).

[014] Para o ensaio de atividade antioxidante em relação a eliminação do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) a amostra foi adicionada a uma solução de DPPH a 0,16 mM, de acordo com a metodologia de Re et al. (Free Radic. Biol. Med. 26:1231-1237, 1999).

[015] Para o ensaio de eliminação do radical ABTS^{•+}, a eliminação do radical cátion ABTS^{•+}, gerado a partir da oxidação de 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS) 7 mM com persulfato de potássio 2,45 mM, mantidos no escuro por 12 a 16 horas antes da utilização de acordo com a metodologia descrita por (Yean e Chen, J. Agric. Food Chem., 43:27-37, 1995). A atividade quelante de ferro e cobre foram realizadas de acordo com as metodologias descritas em (Sánchez-Vioque et al., Ind. Crops Prod., 39:149-153, 2012) e (Saiga et al., J. Agric. Food Chem., 51:3661-3667, 2003), respectivamente.

[016] Os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey para comparações de médias.

[017] Foi observado um grau de hidrólise (GH%) crescente ao longo do tempo para todas as enzimas avaliadas, indicando que durante o período

estudado é possível a obtenção de peptídeos com atividade biológica. Os graus de hidrólises máximos foram obtidos decorrido 8 horas de hidrólise, sendo os maiores valores observados quando a caseína é submetida a papaína e a tripsina. E o menor valor de hidrólise no mesmo período associado a protease neutra.

[018] Em relação atividade de quelar o ferro os hidrolisados proteicos bubalinos apresentam-se eficazes em todos os tempos de hidrólise, destacando-se o tempo de 2 horas (66,28%), 4h (89,55%), 6h (83,64%) e 8h (67,52%) para bromelina, papaína, tripsina e protease neutra, respectivamente. É importante ressaltar que a quelação de ferro manteve-se superior a 50% em todos os tempos avaliados indicando que os hidrolisados com capacidade de se ligar ao íon Fe^{2+} não sofrem novas clivagens, exceto após 8h de hidrólise empregando a bromelina na qual ocorre redução substancial na atividade biológica de quelar o íon Fe^{2+} , mas mantendo-se superior ao controle.

[019] A capacidade de quelação de cobre também foi observada em todos os tempos de hidrólise mantendo-se superior a 30%, excetuando os controles que apresentaram abaixo disso. As maiores atividades foram observadas para bromelina (79,83%, decorrido 2 horas de hidrólise), papaína (72,87%, decorridas 8h de hidrólise), tripsina (após 8h de hidrólise foi possível observar 64,74%) e protease neutra (35,92% após 8h de clivagem).

[020] A eliminação do radical superóxido manteve-se superior a 90% quando o caseinato bubalino foi submetido a hidrólise empregando bromelina e papaína demonstrando alta capacidade de sequestro do radical superóxido.

[021] Os hidrolisados oriundos da caseína bubalina sobretudo os submetidos a ação da papaína e bromelina apresentam alta capacidade de sequestrar o radical superóxido. Os hidrolisados obtidos pela ação da tripsina e protease alcalina apesar da baixa capacidade de sequestro mantiveram certa afinidade com essa molécula apresentando um poder de eliminação razoável de eliminação do radical.

[022] Os hidrolisados derivados da hidrólise por protease alcalina apresentaram capacidade de eliminação desse radical superior a 60% a partir de 2 horas de hidrólise alcançando seu máximo as 8 horas (83,57%).

[023] Os hidrolisados obtidos pela ação de bromelina e papaína apresentaram máxima atividade de sequestro desse radical decorridas 6h de hidrólise, não apresentando essa capacidade em todos os hidrolisados.

[024] Os consumidores tem despertado o interesse por alimentos que desempenham papel funcional no organismo diversos estudos farmacológicos tem demonstrado que existe uma associação entre o consumo de antioxidantes naturais e a diminuição do risco de desenvolver patologias degenerativas. Os hidrolisados derivados da caseína do leite de búfala apresentaram atividade de eliminação do radical ABTS superior a 90% em todos os tempos de hidrólises pela ação das diferentes enzimas, demonstrando uma alta capacidade antioxidante.

[025] Em relação a atividade de eliminação do radical DPPH a protease alcalina, não foi capaz de liberar peptídeos bioativos apropriados para eliminar esse radical, entretanto, é possível verificar que a bromelina e a papaína são capazes de hidrolisar em pontos que liberam fragmentos proteicos capazes de sequestrar e eliminar esse radical demonstrando atividade máxima de 30,59% aos 60 minutos de hidrólise e 33,26% decorridos 2horas de ação enzimática. A tripsina apresentou capacidade de catalisar as ligações peptídicas e liberar fragmentos proteicos capazes de sequestrar o DPPH após 60 minutos de hidrólise cessando essa capacidade nos hidrolisados obtidos em 8horas de hidrólise.

[026] Os antioxidantes naturais têm como principal vantagem em relação aos antioxidantes convencionais o fato dos primeiros não apresentarem uma legislação que restringe o uso podendo ser utilizados tanto para aumentar o tempo de vida de prateleira de diversos produtos como quanto em alimentos funcionais.

[027] O uso de bromelina, tripsina, protease alcalina e papaína mostram-se eficientes e de baixo custo no processo de obtenção de hidrolisados proteicos antioxidantes podendo ser empregadas nos mais diversos setores das indústrias alimentícias e farmacêuticas, obtendo produtos que devido a sua diversidade tecnológica garante produtos de baixo custo e de grande valor biológico

acarretando em um maior valor agregado e em despertar o interesse do consumidor preocupado com sua saúde.

REIVINDICAÇÕES

1. “MÉTODO PARA OBTENÇÃO DE HIDROLISADOS PROTEICOS ANTIOXIDANTES OBTIDOS A PARTIR DA CASEÍNA DO LEITE BUBALINO” **caracterizado por** um processo de obtenção do hidrolisados de caseinato de sódio, a partir de precipitado de leite bubalino, solubilizado em meio aquoso e hidrolisado utilizando proteases.
2. “MÉTODO PARA OBTENÇÃO DE HIDROLISADOS PROTEICOS ANTIOXIDANTES OBTIDOS A PARTIR DA CASEÍNA DO LEITE BUBALINO”, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo fato** de consistir na obtenção de caseinato de sódio a partir de leite bubalino, utilizando utilizado ciclos de precipitação e solubilização com ácidos e base forte.
3. “MÉTODO PARA OBTENÇÃO DE HIDROLISADOS PROTEICOS ANTIOXIDANTES OBTIDOS A PARTIR DA CASEÍNA DO LEITE BUBALINO”, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado pelo** processo de obtenção dos hidrolisados empregando caseinato bubalino e a hidrólise empregando a relação enzima substrato de 1:100 v/vem um período de hidrólise de até 8 h.
4. “MÉTODO PARA OBTENÇÃO DE HIDROLISADOS PROTEICOS ANTIOXIDANTES OBTIDOS A PARTIR DA CASEÍNA DO LEITE BUBALINO”, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelas** proteases utilizadas no processo de hidrólise compreenderem bromelina, papaína, tripsina e protease neutra.

RESUMO

“MÉTODO PARA OBTENÇÃO DE HIDROLISADOS PROTEICOS ANTIOXIDANTES OBTIDOS A PARTIR DA CASEÍNA DO LEITE BUBALINO”. Esta invenção descreve um método de obtenção de hidrolisados proteicos multifuncionais oriundos do caseinato bubalino submetidos a proteólise empregando bromelina, papaína, tripsina e protease neutra. Tendo esses hidrolisados proteicos apresentando potencial biológico em relação à capacidade antioxidante de eliminação de DPPH, ABTS, superóxido e hidroxila, bem como de quelar os íons ferro e cobre *in vitro* com potencial aplicação na indústria alimentícia e farmacêutica, alimento funcional, suplemento alimentar ou desenvolvimento de fármaco, respectivamente.