



UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE EDUCAÇÃO SUPERIOR DO OESTE – CEO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE PLASMA SUÍNO:
CARACTERIZAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE
BIOATIVIDADES DOS HIDROLISADOS
OBTIDOS COM DIFERENTES ENZIMAS E EM
DIFERENTES TEMPOS**

CRISTINE VOGEL

PINHALZINHO, 2019

CRISTINE VOGEL

**HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE PLASMA SUÍNO: CARACTERIZAÇÃO E
DETERMINAÇÃO DE BIOATIVIDADES DOS HIDROLISADOS OBTIDOS COM
DIFERENTES ENZIMAS E EM DIFERENTES TEMPOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação
em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da
Universidade do Estado de Santa Catarina, como
requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em
Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dra. Aniela Pinto Kempka

**Pinhalzinho
2019**

Ficha catalográfica elaborada pelo(a) autor(a), com auxílio do programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CEO/UDESC

CRISTINE VOGEL

**HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE PLASMA SUÍNO: CARACTERIZAÇÃO E
DETERMINAÇÃO DE BIOATIVIDADES DOS HIDROLISADOS OBTIDOS COM
DIFERENTES ENZIMAS E EM DIFERENTES TEMPOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Banca examinadora:

Orientadora: _____

Prof.^a Dra. Anieli Pinto Kempka (UDESC-SC)

Membros:

Prof.^a Dra. Darlene Cavalleiro (UDESC-SC)

Prof.^a Dra. Liziane Schittler (UDESC-SC)

Pinhalzinho, 05/08/2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida, por todos os bons caminhos que traçou em minha vida. Por permitir que nos momentos mais difíceis eu não fraquejasse e seguisse de cabeça erguida, sempre acreditando que tudo é possível.

Aos meus pais, Cecília Maria Wohlfart Vogel e Roque Vogel, por sempre me incentivarem e apoiarem nos meus estudos. Sinto muito pela ausência.

A minha irmã Barbara Vogel, pelo carinho, conselhos, pelo ombro nos momentos de choro e por sempre sonhar meus sonhos comigo. Ao meu cunhado Odinei Luiz Bruxel, por sempre me incentivar seguir o caminho do conhecimento e aprendizado. Ao meu pequenino sobrinho Bernardo Luiz Bruxel, que veio ao mundo para trazer mais alegria ao meu coração.

À minha orientadora Aniela Pinto Kempka, pela sua disponibilidade e apoio prestados sempre que necessário, sempre buscando soluções e inovações para elaboração desta dissertação. Por todos os apontamentos e reflexões durante todo o período do mestrado. Não posso esquecer, a sua grande contribuição em despertar em mim o interesse pela área da Biotecnologia.

Aos membros da banca examinadora, pelo interesse e disponibilidade.

Obrigada Eduarda Baggio Paglia, por toda disponibilidade e ajuda prestadas nos experimentos. Obrigada Fabiane Paula Werlang Schuster e Ivan de Marco que foram muito mais que colegas, foram grandes amigos e incentivadores.

Aos demais colegas do mestrado, Andressa, Gisiéli, Gabriela, Pâmela, Douglas, um muito obrigado, por todos os momentos compartilhados. Agradeço também as equipes dos Laboratórios Biolab e Microlab, pela convivência.

À UDESC - OESTE, em especial ao Laboratório de Bioprocessos pela estrutura física para realização da pesquisa. Ao Programa de Bolsas de Monitoria de Pós-Graduação (PROMOP) pela concessão da bolsa de estudos.

A empresa APC do Brasil pela doação da matéria-prima e a Prozin pela doação da enzima Protezyn APP 3000.

Ao Professor Dr. Ivo Mottin Demiate pela realização da análise de FTIR.

A equipe de vigilância, manutenção e limpeza da UDESC.

OBRIGADA!

“Você nunca sabe que resultados virão da sua ação. Mas se você não fizer nada, não existirão resultados.”

Mahatma Gandhi

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi obter hidrolisados de plasma suíno utilizando uma protease alcalina e uma ácida (pepsina) e determinar as propriedades bioativas destes, incluindo a atividade antimicrobiana, antioxidante (eliminação do radical DPPH e ensaio do poder redutor), antidiabética (inibição da α -amilase e α -glucosidase) e anti-hipertensiva (inibição da enzima conversora da angiotensina). Utilizou-se um DCCR (cuja variáveis foram a temperatura, o pH e a agitação e a resposta foi o grau de hidrólise), após 120 min de reação. A determinação das bioatividades dos peptídeos foram realizadas para os hidrolisados dos tempos 0 min, 15 min, 30 min, 60 min, 90 min e 120 min de reação. O máximo grau de hidrólise, utilizando a protease alcalina, foi obtido na temperatura de 65 °C, pH 8,5, agitação de 125 rpm e relação enzima substrato (E/S) de 5% (m/m) e com a pepsina, na temperatura de 42 °C, pH 2,0, agitação de 125 rpm e apresentando o melhor desempenho no estudo cinético utilizando a relação enzima substrato (E/S) de 4% (m/m). Após otimização, o maior GH obtido com a protease alcalina e a pepsina foi em 120 min de hidrólise, sendo de 45,28% e 28,44%, respectivamente. O hidrolisado da protease alcalina revelou o desaparecimento de proteínas maiores com o decorrer do tempo e o surgimento de proteínas abaixo de 25 kDa. Para os hidrolisados obtidos com a pepsina, o mesmo comportamento foi observado, porém os peptídeos gerados apresentaram bandas mais definidas e menores que 10 kDa. Para 120 min, o hidrolisado de protease alcalina apresentou 43,82% de inibição do radical DPPH, não diferindo estatisticamente do hidrolisado de 90 min (40,79%). Para o hidrolisado obtido com a Pepsina, as maiores porcentagens de inibição do DPPH foram encontradas para o hidrolisado em 30 min (81,59%), em 60 min (78,68%) e em 90 min (81,08%), iguais estatisticamente ($p > 0,05$). O poder antioxidante redutor de ferro dos hidrolisados de plasma suíno foram de 0,547 e 0,751, obtidos com protease alcalina e ácida respectivamente, ambos obtidos em 120 min de hidrólise. A atividade antidiabética dos hidrolisados revelou atividade inibitória para α -amilase e α -glucosidase tanto para os hidrolisados de plasma obtidos com protease alcalina quanto para os hidrolisados obtidos com a pepsina. Os hidrolisados apresentaram aumento na atividade inibitória da ECA até o tempo de 90 min (8,66%) com protease alcalina e para os hidrolisados obtidos com a pepsina, a maior atividade inibitória da ECA foi determinada em 15 min de hidrólise (15,41%). Constatou-se que os hidrolisados com maiores valores de GH nem sempre apresentaram os maiores valores nas atividades. Notou-se também que a extensão da hidrólise de plasma suíno, determinada pelo grau de hidrólise, e as porcentagens de inibição dos peptídeos bioativos são fortemente influenciadas pela enzima, condições de hidrólise (relação E/S, temperatura, pH e tempo). Ambos os peptídeos gerados apresentaram bons resultados para as bioatividades testadas, no entanto, como as bioatividades dos peptídeos foram determinadas do hidrolisado bruto, mais experimentos são necessários para avaliar a eficácia desses peptídeos purificados. A pesquisa realizada até o momento fornece uma forte indicação de que o plasma suíno é uma boa fonte de proteína com potencial para fornecer compostos bioativos para aplicação funcional/nutracêutica.

Palavras-chave: Plasma Suíno. Proteases. Hidrolisados. Peptídeos Bioativos.

ABSTRACT

The objective of this work was to obtain porcine plasma hydrolysates using an alkaline and an acid protease (pepsin) and to determine their bioactive properties, including antimicrobial, antioxidant (DPPH radical elimination and reducing power assay), antidiabetic (α inhibition) activity. α -amylase and α -glucosidase) and antihypertensive (angiotensin-converting enzyme inhibition). A DCCR was used (whose variables were temperature, pH and agitation and the response was the degree of hydrolysis) after 120 min of reaction. The determination of peptide bioactivities was performed for the hydrolysates of the 0 min, 15 min, 30 min, 60 min, 90 min and 120 min reaction times. The maximum degree of hydrolysis using alkaline protease was obtained at 65 ° C, pH 8.5, stirring at 125 rpm and substrate enzyme ratio (E / S) of 5% (w / w) and with pepsin at 42 ° C, pH 2.0, shaking at 125 rpm and showing the best performance in the kinetic study using the substrate enzyme ratio (E / S) of 4% (w / w). After optimization, the highest GH obtained with alkaline protease and pepsin was in 120 min of hydrolysis, being 45.28% and 28.44%, respectively. The alkaline protease hydrolyzate revealed the disappearance of larger proteins over time and the appearance of proteins below 25 kDa. For the hydrolysates obtained with pepsin, the same behavior was observed, but the generated peptides presented more defined bands and smaller than 10 kDa. For 120 min, the alkaline protease hydrolyzate showed 43.82% inhibition of DPPH radical, not statistically differing from the 90 min hydrolysate (40.79%). For the hydrolyzate obtained with Pepsin, the highest percentages of DPPH inhibition were found for the hydrolyzate in 30 min (81.59%), in 60 min (78.68%) and in 90 min (81.08%). Statistically equal ($p > 0.05$). The iron reducing antioxidant power of porcine plasma hydrolysates were 0.547 and 0.751, obtained with alkaline and acid protease respectively, both obtained in 120 min of hydrolysis. The antidiabetic activity of hydrolysates revealed inhibitory activity for α -amylase and α -glucosidase for both alkaline protease and pepsin hydrolysates. Hydrolysates showed an increase in ACE inhibitory activity up to 90 min (8.66%) with alkaline protease and for pepsin hydrolysates the highest ACE inhibitory activity was determined in 15 min hydrolysis (15.41 %). It was found that hydrolysates with higher GH values did not always present the highest values in activities. It was also noted that the extent of porcine plasma hydrolysis, determined by the degree of hydrolysis, and the inhibition percentages of bioactive peptides are strongly influenced by the enzyme, hydrolysis conditions (I / O ratio, temperature, pH and time). Both generated peptides showed good results for the tested bioactivities, however, as the peptide bioactivities were determined from the crude hydrolyzate, more experiments are needed to evaluate the efficacy of these purified peptides. Research to date provides a strong indication that porcine plasma is a good source of protein with the potential to provide bioactive compounds for functional / nutraceutical application.

Keywords: Porcine Plasma. Hydrolyzed Proteases. Bioactive Peptides.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Composição do sangue suíno (plasma e fração celular).....	27
Figura 2 -	Plasma suíno seco utilizado no estudo.....	28
Figura 3 -	Fluxograma da obtenção dos hidrolisados proteicos de plasma suíno utilizando uma protease alcalina	47
Figura 4 -	Comparação entre o valor experimental (observado) e calculado da variável de resposta (GH) (predito).....	55
Figura 5 -	Superfícies de Resposta e Curvas de Contorno referentes ao grau de hidrólise do plasma suíno em função da temperatura e pH (a) temperatura e agitação (b) e pH e agitação (c).....	55
Figura 6 -	Aspecto visual do experimento C10 (amostra sem enzima após 120 min submetida as mesmas condições de hidrólise) e do experimento E10 (amostra com enzima após 120 min de hidrólise).....	57
Figura 7 -	Gráfico de duplo recíproco (Lineweaver-Burk) do grau de hidrólise (%) pela protease alcalina versus a concentração de plasma suíno	59
Figura 8 -	Curva cinética de hidrólise do plasma suíno com protease alcalina, em 65 °C, pH 8,5, 125 rpm e 5% de substrato.....	60
Figura 9 -	Eletroforese SDS-PAGE dos hidrolisados de plasma suíno obtidos em 0 min, 15 min, 30 min, 60 min, 90 min e 120 min, nas condições otimizadas e com 5% de substrato (a) e das mesmas amostras (exceto o tempo zero) porém diluídas e padronizadas para se obter uma concentração de 5,0 mg.mL ⁻¹ (b), utilizando marcador de massa molecular de proteína de ampla faixa (M).....	63
Figura 10 -	Espectros de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) de plasma suíno utilizando uma protease alcalina.....	65
Figura 11 -	Poder redutor dos hidrolisados de plasma suíno analisados em diferentes tempos e concentrações.....	70
Figura 12 -	Fluxograma da obtenção do hidrolisado proteico de plasma suíno utilizando a enzima Pepsina.....	81
Figura 13 -	Comparação entre o valor experimental (observado) e calculado da variável de resposta (GH) (predito).....	89
Figura 14 -	Superfícies de Resposta e Curvas de Contorno referentes ao grau de hidrólise do plasma suíno com pepsina em função da temperatura e pH (a) temperatura e agitação (b) e pH e agitação (c).....	90
Figura 15 -	Aspecto visual do experimento C10 (amostra sem enzima após 120 min submetida as mesmas condições de hidrólise) e do experimento E10 (amostra com enzima após 120 min de hidrólise).....	91
Figura 16 -	Gráfico de duplo recíproco (Lineweaver-Burk) do grau de hidrólise (%) pela enzima Pepsina versus a concentração de plasma suíno.....	92
Figura 17 -	Curva cinética de hidrólise do plasma suíno com Pepsina, em 42 °C, pH 2,0, 125 rpm e 4% de substrato.....	94
Figura 18 -	Eletroforese SDS-PAGE dos hidrolisados de plasma suíno obtidos em 0 min, 15 min, 30 min, 60 min, 90 min e 120 min, nas condições otimizadas e com 4% de substrato (a) e das mesmas amostras (exceto o tempo zero) porém diluídas e padronizadas para se obter uma concentração de 5,0 mg.mL ⁻¹ (b), utilizando marcador de massa molecular de proteína de ampla faixa (M).....	96
Figura 19 -	Espectros de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) de plasma suíno utilizando Pepsina.....	98
Figura 20 -	Poder redutor dos hidrolisados de plasma suíno analisados em diferentes tempos e concentrações.....	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Composição de aminoácidos de plasma seco.....	28
Tabela 2 -	Variáveis e níveis, com valores codificados e reais, do Delineamento Composto Central Rotacional com pontos axiais utilizado no estudo da otimização da hidrólise de plasma suíno utilizando uma protease alcalina.....	46
Tabela 3 -	Caracterização do plasma suíno utilizada para a preparação dos hidrolisados....	52
Tabela 4 -	Resultados do grau de hidrólise do plasma suíno pela protease alcalina para os experimentos do Delineamento Composto Central Rotacional com pontos axiais utilizado na otimização das variáveis através da metodologia de superfície de resposta.....	53
Tabela 5 -	Estimativas dos coeficientes obtidos a partir do modelo de regressão no DCCR para a temperatura, pH e agitação no processo de hidrólise enzimática do plasma com protease alcalina.....	54
Tabela 6 -	ANOVA para o modelo polinomial de segunda ordem referente ao grau de hidrólise do plasma obtido com o uso da protease alcalina.....	54
Tabela 7 -	Parâmetros cinéticos K_m , $v_{máx}$ da protease alcalina utilizando o plasma suíno como substrato e coeficiente de correlação linear obtido pela linearização de Lineweaver–Burk	59
Tabela 8 -	Cor instrumental dos hidrolisados de plasma suíno obtidos com uso da protease alcalina e em diferentes tempos.....	62
Tabela 9 -	Atividade antioxidante referente a eliminação de radicais DPPH dos hidrolisados de plasma suíno obtidos com protease alcalina em diferentes tempos e concentrações de proteína solúvel	67
Tabela 10 -	Percentual de inibição de α -amilase pelo plasma suíno em diferentes concentrações e tempos de hidrólise.....	72
Tabela 11 -	Percentual de inibição de α -glucosidase pelo plasma suíno em diferentes concentrações e tempos de hidrólise.....	72
Tabela 12 -	Atividade inibitória da ECA de plasma suíno preparado com protease alcalina influenciados pelo tempo de hidrólise.....	74
Tabela 13 -	Variáveis e níveis, com valores codificados e reais, do Delineamento Composto Central Rotacional com pontos axiais utilizado no estudo da otimização da hidrólise de plasma suíno utilizando Pepsina.....	80
Tabela 14 -	Caracterização do plasma suíno utilizado para a preparação dos hidrolisados.....	87
Tabela 15 -	Resultados do grau de hidrólise do plasma suíno com Pepsina para os experimentos do Delineamento Composto Central Rotacional com pontos axiais utilizado na otimização das variáveis através da metodologia de superfície de resposta (MSR).....	87
Tabela 16 -	Estimativas dos coeficientes obtidos a partir do modelo de regressão no DCCR para a temperatura, pH e agitação no processo de hidrólise enzimática do plasma com Pepsina.....	88
Tabela 17 -	ANOVA para o modelo polinomial de segunda ordem referente ao grau de hidrólise do plasma obtido com o uso da Pepsina.....	88
Tabela 18 -	Teste de Significância ANOVA, somente com as variáveis significativas.....	89
Tabela 19 -	Parâmetros cinéticos K_m , $v_{máx}$ da Pepsina utilizando o plasma suíno como substrato e coeficiente de correlação linear obtido pela linearização de Lineweaver-Burk.....	93
Tabela 20 -	Cor instrumental dos hidrolisados de plasma suíno obtidos com uso de Pepsina e em diferentes tempos.....	94

Tabela 21 -	Atividade antioxidante referente a eliminação de radicais DPPH dos hidrolisados de plasma suíno obtidos com Pepsina em diferentes tempos e concentrações de proteína solúvel.....	100
Tabela 22 -	Percentual de inibição de α -amilase pelo plasma suíno em diferentes concentrações e tempos de hidrólise.....	103
Tabela 23 -	Percentual de inibição de α -glucosidase pelo plasma suíno em diferentes concentrações e tempos de hidrólise.....	104
Tabela 24 -	Atividade inibitória da ECA de plasma suíno preparado com Pepsina influenciados pelo tempo de hidrólise.....	105

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Enzimas e condições de hidrólise para diferentes fontes de proteína, tempos de hidrólise e condições de inativação das enzimas com o respectivo grau de hidrólise.....	23
Quadro 2 -	Proteínas utilizadas para obtenção de peptídeos com atividade antimicrobiana, contra diversas cepas de micro-organismos e os resultados obtidos.....	31
Quadro 3 -	Proteínas utilizadas para obtenção de peptídeos com atividade antioxidante.....	33
Quadro 4 -	Proteínas utilizadas para obtenção de peptídeos inibidores da enzima conversora da angiotensina, metodologias utilizadas para a determinação e os resultados obtidos.....	38

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	17
2. OBJETIVOS DA PESQUISA.....	19
2.1 Objetivo geral	19
2.2 Objetivos específicos.....	19
CAPÍTULO I – HIDROLISADOS PROTEICOS: PRODUÇÃO E BIOATIVIDADES...	21
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	21
3.1 PROTEASES E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA.....	21
3.2 PLASMA SUÍNO.....	27
3.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	30
3.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	32
3.5 ATIVIDADE ANTI-HIPERTENSIVA.....	36
3.6 OUTRAS BIOATIVIDADES.....	40
CAPÍTULO II	43
4 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO PLASMA SUÍNO UTILIZANDO UMA PROTEASE ALCALINA E VERIFICAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO GRAU DE HIDRÓLISE NAS BIOATIVIDADES DOS HIDROLISADOS.....	43
4.1 INTRODUÇÃO.....	43
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	44
4.2.1 Reagentes	44
4.2.2 Equipamentos.....	44
4.2.5 Otimização das condições experimentais para a obtenção dos hidrolisados de plasma suíno.....	45
4.2.6 Obtenção dos hidrolisados proteicos de plasma suíno	46
4.2.7 Determinação da proteína solúvel em TCA dos hidrolisados de plasma suíno	47
4.2.8 Determinação dos parâmetros cinéticos da protease (K_m e $v_{máx}$).....	48
4.2.9 Análise da cor instrumental dos hidrolisados proteicos de plasma suíno	48
4.2.10 Tamanho das frações peptídicas através da eletroforese SDS-PAGE.....	49

4.2.11	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) dos hidrolisados de plasma suíno	49
4.2.12	Atividade antimicrobiana.....	49
4.2.13	Atividade antioxidante.....	50
4.2.13.1	<i>Atividade de eliminação de radicais DPPH</i>	50
4.2.13.2	<i>Poder antioxidante redutor de ferro</i>	50
4.2.14	Ensaio de inibição da α -amilase e da α -glucosidase (atividade antidiabética)	50
4.2.15	Atividade inibitória da enzima conversora da angiotensina (ECA) (atividade anti-hipertensiva).....	51
4.2.16	Análise estatística	52
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.3.1	Caracterização físico-química do plasma suíno	52
4.3.2	Otimização das condições experimentais para a obtenção dos hidrolisados de plasma suíno.....	53
4.3.3	Determinação dos parâmetros cinéticos da protease (K_m e $V_{máx}$).....	58
4.3.4	Determinação do grau de hidrólise do plasma suíno ao longo do tempo	60
4.3.5	Análise da cor instrumental dos hidrolisados proteicos de plasma suíno.....	62
4.3.6	Tamanho das frações peptídicas através da eletroforese SDS-PAGE.....	62
4.3.7	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) dos hidrolisados de plasma suíno	65
4.3.8	Atividade antimicrobiana.....	66
4.3.9	Atividade antioxidante.....	67
4.3.9.1	<i>Atividade de eliminação de radicais DPPH</i>	67
4.3.9.2	<i>Poder antioxidante redutor de ferro</i>	69
4.3.10	Ensaio de inibição da α -amilase e da α -glucosidase (atividade antidiabética)	71
4.3.11	Atividade inibitória da enzima conversora da angiotensina (ECA) (atividade anti-hipertensiva).....	73
4.4	Conclusão.....	75
CAPÍTULO III.....		77

5	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO PLASMA SUÍNO UTILIZANDO UMA PROTEASE ÁCIDA E VERIFICAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO GRAU DE HIDRÓLISE NAS BIOATIVIDADES DOS HIDROLISADOS.....	77
5.1	INTRODUÇÃO.....	77
5.2	MATERIAL E MÉTODOS	78
5.2.1	Reagentes	78
5.2.2	Equipamentos.....	79
5.2.3	Caracterização físico-química do plasma suíno	79
5.2.4	Otimização das condições experimentais para a obtenção dos hidrolisados de plasma suíno.....	80
5.2.5	Obtenção dos hidrolisados proteicos de plasma suíno	81
5.2.6	Determinação da proteína solúvel em TCA dos hidrolisados de plasma suíno	82
5.2.7	Determinação dos parâmetros cinéticos da protease (K_m e $v_{máx}$).....	82
5.2.8	Análise da cor instrumental dos hidrolisados proteicos de plasma suíno	83
5.2.9	Tamanho das frações peptídicas através da eletroforese SDS-PAGE.....	83
5.2.10	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) dos hidrolisados de plasma suíno	83
5.2.11	Atividade antimicrobiana.....	83
5.2.12	Atividade antioxidante.....	84
5.2.12.1	<i>Atividade de eliminação de radicais DPPH</i>	<i>84</i>
5.2.12.2	<i>Poder antioxidante redutor de ferro.....</i>	<i>84</i>
5.2.13	Ensaio de inibição da α -amilase e da α -glucosidase (atividade antidiabética)	85
5.2.14	Atividade inibitória da enzima conversora da angiotensina-I (ECA) (atividade anti-hipertensiva).....	86
5.2.15	Análise estatística	86
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	86
5.3.1	Caracterização físico-química do plasma suíno	86
5.3.2	Otimização das condições experimentais para a obtenção dos hidrolisados de plasma suíno.....	87

5.3.3	Determinação dos parâmetros cinéticos da protease (K_m e $v_{máx}$).....	92
5.3.4	Determinação do grau de hidrolise do plasma suíno ao longo do tempo	93
5.3.5	Análise da cor instrumental dos hidrolisados proteicos de plasma suíno	94
5.3.6	Tamanho das frações peptídicas através da eletroforese SDS-PAGE	95
5.3.7	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) dos hidrolisados de plasma suíno	97
5.3.8	Atividade antimicrobiana	98
5.3.9	Atividade antioxidante	100
5.3.9.1	<i>Atividade de eliminação de radicais DPPH</i>	100
5.3.9.1	<i>Poder antioxidante redutor de ferro</i>	101
5.3.10	Ensaio de inibição da α -amilase e da α -glucosidase (atividade antidiabética)	102
5.3.11	Atividade inibitória da enzima conversora da angiotensina-I (atividade anti-hipertensiva)	105
5.4	Conclusão	106
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107

1. INTRODUÇÃO GERAL

A estrutura das proteínas pode ser modificada através de tratamentos físicos, químicos e enzimáticos, alterando, por conseguinte suas propriedades funcionais. A técnica envolvendo a modificação de proteínas pelo uso de enzimas é a mais requerida devido as condições mais brandas de processo, como baixas temperaturas, a maior facilidade de controle da reação e a formação mínima de subprodutos (ADLER-NISSEN, 1979; KRISTINSSON; RASCO, 2000).

Entre as enzimas, as proteases representam cerca de 60% das enzimas usadas nas indústrias química, farmacêutica e alimentícia. As proteases hidrolisam a ligação peptídica entre proteínas, sendo interessante sua aplicação para obtenção de peptídeos bioativos, pois o interesse por estes compostos está em constante crescimento, visando a sua identificação, composição, caracterização da estrutura e bioatividades. Peptídeos biologicamente ativos desempenham funções na regulação e modulação metabólica, como também podem ser usados como ingredientes alimentares, funcionais ou nutracêuticos/farmacêuticos para auxiliar na saúde humana e na prevenção de doenças (CHALAMAIAH et al., 2013; LAKSHMI; MUNI KUMAR; HEMALATHA, 2018); (NAJAFIAN; BABJI, 2012; NIU et al., 2018).

Os peptídeos bioativos são definidos como sequências de aminoácidos (variam em tamanho de 2 a 20 resíduos) que se encontram nas proteínas nativas e podem exercer funções biológicas quando liberados por um processo de hidrólise *in vivo* ou *in vitro*. Tais peptídeos bioativos possuem potencial para reduzir o risco de doenças crônicas que afetam os principais sistemas do corpo (cardiovascular, digestivo, endócrino, imunológico e nervoso) e promover a saúde humana, levando ao interesse científico e comercial (ERDMANN; CHEUNG; SCHRÖDER, 2008; HARTMANN; MEISEL, 2007).

Um exemplo de subproduto que pode ser reutilizado é o sangue suíno proveniente de abatedouros, que constitui de 3-5% do peso vivo de um animal, (HOYO; MOURE; RENDUELES, 2007). O plasma sanguíneo é obtido após a separação dos glóbulos vermelhos do sangue total. Possui diversas aplicações industriais devido à funcionalidade de seus constituintes proteicos. Sua incorporação em produtos cárneos é realizada visando aproveitar suas propriedades geleificantes, espessantes, emulsificantes e espumantes, embora outros atributos funcionais, como propriedades bioativas já foram verificadas e são de grande interesse (DÀVILA et al., 2007a).

O interesse por explorar a potencialidade do sangue como fonte de proteína tem sido limitado. Durante muito tempo o sangue tem sido considerado como resíduo, sendo eliminado, ou como subproduto processado, visando a separação de seus componentes ou seu uso em ração animal. No entanto, devido ao grande volume gerado (em média, 7 litros de sangue por animal)

e à sua composição, tal subproduto da indústria da carne possui diversos usos potenciais. Além disso, o desafio para a indústria está na capacidade de introduzir as melhorias necessárias nas operações higiênicas de sangramento e recolhimento, que possam garantir tanto a sua qualidade como a segurança para as demais aplicações (LYNCH et al., 2017).

Esta dissertação demonstra uma possibilidade de utilização do plasma suíno para a produção de peptídeos bioativos e está estruturada em três capítulos na forma de artigos. No capítulo I é apresentada uma revisão bibliográfica sobre proteases, sobre o processo de hidrólise enzimática, um apanhado sobre plasma suíno e também uma visão sobre a obtenção de hidrolisados de diversas fontes proteicas e seu emprego como compostos bioativos. Essa fundamentação teórica, guia a interpretação e a discussão dos resultados dos capítulos seguintes.

O capítulo II trata da caracterização da matéria-prima, seguida de um estudo experimental. A aplicação da metodologia de planejamento experimental consistiu na determinação de uma faixa de temperatura, pH e agitação ótimos para o desempenho máximo de grau de hidrólise da Protease alcalina, e posterior verificação da potencialidade desses hidrolisados referente as propriedades bioativas.

O capítulo III é composto pelo mesmo perfil de análises do Capítulo II, porém avaliou-se os hidrolisados de plasma suíno obtidos a partir do uso de uma protease ácida (Pepsina). Ao final do capítulo II e III são apresentadas as conclusões, que respondem as indagações apontadas nos objetivos da dissertação, concluindo o estudo, segundo o entendimento dos resultados apresentados.

2. OBJETIVOS DA PESQUISA

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral desta pesquisa foi obter hidrolisados do plasma suíno utilizando duas enzimas proteolíticas (protease alcalina e Pepsina), otimizando as condições operacionais da hidrólise em diferentes tempos e determinando as bioatividades dos hidrolisados obtidos.

2.2 Objetivos específicos

- i. Caracterizar o plasma suíno quanto aos aspectos físico-químicos;
- ii. Avaliar os efeitos da temperatura, pH e agitação, através de planejamento experimental, na obtenção da melhor condição de hidrólise do plasma suíno, utilizando uma protease alcalina e uma protease ácida e tendo como resposta o grau de hidrólise;
- iii. Obter os hidrolisados pela ação enzimática em diferentes tempos;
- iv. Ajustar os modelos cinéticos aos dados experimentais;
- v. Caracterizar os hidrolisados pelo método de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE);
- vi. Avaliar a estrutura dos hidrolisados através da análise de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR);
- vii. Avaliar a atividade antimicrobiana dos hidrolisados proteicos obtidos do plasma suíno contra *Salmonella* Enteritidis, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Escherichia coli*.
- viii. Avaliar a atividade antioxidante através do método DPPH;
- ix. Determinar o poder antioxidante redutor de ferro (FRAP);
- x. Avaliar a atividade da α -amilase e α -glucosidase dos hidrolisados;
- xi. Avaliar a atividade inibitória da enzima conversora da angiotensina (ECA);

CAPÍTULO I – HIDROLISADOS PROTEICOS: PRODUÇÃO E BIOATIVIDADES

Este capítulo apresenta uma revisão geral da literatura no que engloba itens relacionados as proteases, sobre hidrólise enzimática, sobre a matéria-prima empregada no estudo e sobre diversas propriedades bioativas (fontes de matérias-primas e resultados obtidos).

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 PROTEASES E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Dentre os vários grupos de enzimas hidrolíticas existentes, destacam-se as proteases (peptidases ou enzimas proteolíticas), que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas das proteínas, tendo como produtos os peptídeos e os aminoácidos. Segundo o Comitê de Nomenclatura Enzimática (EC) da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (NCIUBMB,1992), as peptidases pertencem à classe 3 (hidrolases) e subclasse 3.4 (peptídeo-hidrolases ou peptidases). As enzimas da subclasse EC 3.4 são subsequentemente classificadas como exopeptidases (EC 3.4.11-19) e endopeptidases (EC 3.4.21-99). Estes grupos referem-se à capacidade das enzimas em clivar ligações peptídicas nas extremidades ou no interior da cadeia polipeptídica, respectivamente. Também podem ser classificados de acordo com o intervalo de pH que elas possuem uma maior atividade: ácido (pH 2 a 6), neutro (pH 6 a 8) e alcalino (pH 8 a 13) (RAO et al., 1998; SABOTIČ; KOS, 2012).

As principais fontes de obtenção de enzimas proteolíticas incluem as plantas, os animais e os micro-organismos. As proteases microbianas estão entre as enzimas hidrolíticas mais comercializadas, representando aproximadamente 60%, devido principalmente à sua ampla diversidade bioquímica, o rápido crescimento dos micro-organismos produtores e à necessidade de pequenos espaços para o seu cultivo, além do processo de produção ser mais fácil e seguro (ZAMBARE; NILEGAONKAR; KANEKAR, 2011).

As proteases possuem uma vasta gama de aplicação na indústria de alimentos relacionadas ao valor nutricional, funcional e sensorial dos alimentos, além de proporcionar benefícios para a saúde (TAVANO, 2013). Muitas proteases têm sido utilizadas para a geração de peptídeos bioativos utilizando a hidrólise enzimática a partir de proteínas, sendo empregadas as proteases tanto de origem animal, vegetal e/ou microbiana (KORHONEN; PIHLANTO, 2006; SHAHIDI; ZHONG, 2008).

Proteases alcalinas tem uma ampla especificidade de substrato e podem hidrolisar a maioria das ligações peptídicas dentro de uma molécula de proteína. A enzima Alcalase® (EC 3.4.21.62) por exemplo, atua como uma endoprotease da serina e é estável em uma faixa de pH entre 5 e 11,5, e tem uma temperatura ótima em 60 °C. Esta enzima pertence a marca registrada da Novozymes Corp. que é produzida através da fermentação submersa do micro-organismo *Bacillus licheniformis* (PÉREZ-GÁLVEZ et al., 2011).

A Pepsina (EC 3.4.23.1) é uma protease manomérica, na qual sua estrutura secundária é composta principalmente com folhas β , possuindo de 330 a 350 resíduos de aminoácidos com caráter mais ácido e pI muito baixo (KAGEYAMA, 2002). Em pH 1,3, a Pepsina tende a hidrolisar as ligações peptídicas nas quais o terminal amino é fenilalanina, triptofano, tirosina ou leucina. Em pH 2, a Pepsina pré-hidrolisa as moléculas de proteínas naturais. Em pH 4, pode digerir alguns polipeptídeos específicos, mas perde a sua atividade em pH>6 (FUJINAGA et al., 1995; LI et al., 2018; LUO et al., 2018).

O processo de hidrólise enzimática consiste na clivagem de moléculas de proteína em peptídeos de vários tamanhos e também aminoácidos. Peptídeos são fragmentos proteicos específicos que podem apresentar atividade biológica, incluindo propriedades antioxidantes, antimicrobianas e anti-hipertensivas, influenciando positivamente na saúde humana. Em alguns casos, os peptídeos bioativos gerados durante a hidrólise proteolítica podem exercer efeitos multifuncionais, tais como atividades antioxidante, antimicrobiana, anti-hipertensiva, antitrombótica, anticâncer, imunomodulatória ou opióide (KORHONEN; PIHLANTO, 2006). Essas propriedades dependem de vários fatores, tais como, o tipo de protease utilizada, as condições de hidrólise e a composição de aminoácidos, sequência e configuração dos peptídeos (TAVANO, 2013).

O conceito de grau de hidrólise (GH) é usado para caracterizar a hidrólise de proteínas sendo definido como a proporção de ligações peptídicas clivadas em um hidrolisado proteico (UDENIGWE; HOWARD, 2013). O GH afeta o tamanho dos peptídeos e, portanto, a composição de aminoácidos, o que pode afetar diretamente o sabor do hidrolisado proteico, produzindo peptídeos com sabor amargo como também descreve a atividade biológica dos peptídeos formados durante a hidrólise (KRISTINSSON, 2014).

Os principais métodos utilizados para a medição do GH incluem a utilização de métodos de pH-stat, ácido trinitrobenzenossulfônico (TNBS), o-ftaldialdeído (OPA) e azoto solúvel em ácido tricloroacético (SN-TCA) não existindo consenso quanto ao melhor método. Quanto ao método do TCA, este resulta na precipitação de proteínas não hidrolisadas e fragmentos proteicos, e os pequenos peptídeos e aminoácidos livres encontram-se no sobrenadante, sendo

que essa liberação de peptídeos solúveis pode estar relacionada com o GH (MORAIS et al., 2013).

O Quadro 1 mostra as enzimas e condições de hidrólise envolvendo fontes de substratos variados (animais, vegetais e microbianas), além dos tempos de hidrólise e condições de inativação das enzimas, e o respectivo GH obtido em cada estudo.

Quadro 1 – Enzimas e condições de hidrólise para diferentes fontes de proteína, tempos de hidrólise e condições de inativação das enzimas com o respectivo grau de hidrólise.

Fonte da Proteína	Enzima(s) e Condições de hidrólise	Tempo de hidrólise e inativação enzimática	Grau de Hidrólise (GH)	Referência
Alga comestível (<i>Porphyra yezoensis</i>)	Pepsina: pH 2, T = 45 °C, [E/S] 1:40 (m/m)	Tempo de hidrólise: 6 h Inativação: aumento pH 8,0 com NaOH 0,1 M	Pepsina: 35%	(INDUMATHI ; MEHTA, 2016)
Bagaço de malte	Cepa de <i>Bacillus cereus</i> sp. utilizada como fonte da enzima T = 32 °C	Tempo de hidrólise: 24 h Inativação: 95 °C/5 min.	2 h: 2,65% 4 h: 3,81% 24 h: 21,80%	(KOTLAR; PONCE; ROURA, 2013)
Caseinato de Sódio	Papaína: pH 7; T = 37 °C; [E/S] 0,5/100; 300 rpm Pancreatina: pH 8; T = 37 °C; [E/S] 0,5/100; 300 rpm Tripsina: pH 7; T = 37 °C; [E/S] 0,5/100; 300 rpm	Tempo de hidrólise: 24 h Inativação: 100 °C/10 min	Papaína: 22,06% Pancreatina: 20,91% Tripsina: 20,68%	(LUO; PAN; ZHONG, 2014)
Carcasas de frango manualmente desossadas (CMD)	Papaína: pH 6,5; T = 60 °C; [E/S] 1:250 Flavourzyme®: pH 7; T = 50 °C; [E/S] 1:250 Protamex: pH 7; T = 50 °C; [E/S] 1:250	Tempo de hidrólise: 120 min Inativação: 95 °C/15 min	Papaína: 43,19% Flavourzyme®: 20,25% Protamex: 51,31%	(OLIVEIRA et al., 2015)
Clara de ovo de avestruz	Tripsina: pH 8; T = 37 °C; [E/S] 1:20 p/p	Tempo de hidrólise: 10 h Inativação: 100 °C/15 min	Tripsina: 42%	(TANZADEH PANAH et al., 2013)
Colágeno da pele da cavala espanhola (<i>Nipponius Scomberomorous</i>)	Pepsina: pH = 2,5; T=37 °C; [E/S] = 1:20	Tempo de hidrólise: 5 h Inativação: 90 °C/10 min	-	(CHI et al., 2014)
Farinha de <i>Jatropha curcas</i> isolada	Alcalase®: pH 8, T = 50 °C, [E/S] 0,3 UA/g Pepsina-pancreatina: pH 2-7,5, T= 37 °C, [E/S] 1:10	Tempo de hidrólise: 120 min Inativação: 80 °C/20 min	Alcalase®: (11,7% em 60 min de hidrólise) (13,9% em 90 min de hidrólise) (12,4% em 120 min de hidrólise) Pepsina-pancreatina: (19,1% em 60 min de hidrólise) (21,1% em 90 min de hidrólise)	(MARRUFO-ESTRADA et al., 2013)

			(21,5% em 120 min de hidrólise)	
Farinha de soja desengordurada	Alcalase®, Flavourzyme® e Novozym: pH 7; T = 40 °C)	Tempo de hidrólise: 480 min. Inativação: 85 °C/15 min	Alcalase®: 35,1% Flavourzyme®: 39,5% Novozym: 33,3%	(HRČKOVÁ; RUSŇÁKOVÁ; ZEMANOVIČ, 2002)
Hemoglobina Suína	Flavourzyme®: pH =6,5; T = 45 °C; [E/S] = 0,5% Papaína: pH = 6,5; T = 37 °C; [E/S] = 0,3% Alcalase®: pH = 8; T = 55 °C; [E/S] = 0,2% Pepsina: pH = 2; T = 37 °C; [E/S] = 1,6% Tripsina: pH = 7,5; T = 45 °C; [E/S] = 0,2%	Tempo de hidrólise: 8 h Inativação: 100 °C/10 min	1 h de hidrólise: (Tripsina: 2,0%; Flavourzyme®: 3,05%; Papaína: 5,41%; Pepsina: 7,71% e Alcalase®: 17,0%) 8h de hidrólise: (Tripsina: 5,45%; Flavourzyme®: 6,90%; Papaína: 9,15%; Pepsina: 12,61%; Alcalase®: 21,83%)	(SUN; LUO, 2011)
Hemoglobina Suína	Alcalase®: pH 8,5; T = 50 °C; [E/S] 2,0% Flavourzyme®: pH 7,5; T = 40 °C; [E/S] 2,0%)	Tempo de hidrólise: 10 h Inativação: Alcalase® (50 °C/20 min); Flavourzyme® (90 °C/20 min)	Alcalase®: 9,79% Flavourzyme®: 18,75%	(CHANG; WU; CHIANG, 2007)
	Alcalase® (pH 8,5; 50 °C, [E/S] 2,0%) Flavourzyme® (pH 7,5; 40 °C; [E/S] 0,5%-1,0%-2,0%)	Primeiro estágio: 10 h Segundo estágio: Alcalase®/4 h seguida da adição da Flavourzyme®/6 h Inativação: ajuste do pH para 4,0 (50 °C/20 min Alcalase®) e (90 °C/20 min Flavourzyme)	Primeiro estágio: Alcalase® (9,87%) Flavourzyme (18,75%) Segundo estágio: Alcalase® (7,66% para 2,0%) Flavourzyme® (11,42% para 0,5%), (13,14% para 1,0%) e (14,06% para 2,0%) durante 6 h	
Hemoglobina Suína	Pepsina: pH 2; T = 37 °C; [E/S] 3/100 (p/p) Tripsina: pH 7,5; T = 45 °C; [E/S] 3/100 (p/p) Neutra: pH 7; T = 45 °C; [E/S] 3/100 (p/p) Papaína: pH 8; T = 45 °C; [E/S] 3/100 (p/p) Protamex: pH 6,5; T = 37 °C; [E/S] 3/100 (p/p) Alcalase®: pH 8; T = 55 °C; [E/S] 3/100 (p/p)	Tempo de hidrólise: 6 h Inativação: 100 °C / 10 min	Pepsina: 7,0% Tripsina: 15,0% Neutra: 9,05% Papaína: 15,03% Protamex: 8,19% Alcalase®: 16,46%	(DENG et al., 2014)

Ovas de carpas (<i>Cyprinus carpio</i>)	Pepsina: pH = 2; T = 37 °C; [E/S] = 1,5% (p/p) Tripsina: pH = 8; T = 37 °C; [E/S] = 1,5% (p/p) Alcalase®: pH = 8; T = 55 °C; [E/S] = 1,5% (m/p)	Tempo de hidrólise: 180 min Inativação: 85° - 95 °C/20 min	Pepsina: 30%; Tripsina: 19,5%; Alcalase®: 12,7%	(CHALAMAI AH et al., 2015)
Ovomucina isolada de albumina de ovo	Neutrase: pH 7; T = 50 °C; [E:S] 1:25 (p/p) Flavourzyme®: pH 7; T = 50 °C; [E:S] 1:25 (p/p) Alcalase®: pH 8; T = 50 °C; [E:S] 1:25 (p/p) Pronase: pH 8; T = 37 °C; [E:S] 1:25 (p/p)	Tempo de hidrólise: 24 h Inativação: 97 °C/10 min	Neutrase: 9,0% Flavourzyme®: 35,0% Alcalase®: 60,0 % Pronase: 90,0%	(HAMMERSH ØJ; NEBEL; CARSTENS, 2008)
Okara	Alcalase®: pH 9; T = 55 °C; [E/S] 10/100 p/p Flavourzyme®: pH 7; T = 50 °C; [E/S] 10/100 p/p	Tempo de hidrólise: 180 min Inativação: 85 °C/20 min	Alcalase® 0 min: 0,0% 5 min: 8,4% 25 min: 16,8% 75 min: 25,2% 180 min: 33,6% Flavourzyme® 0 min: 0,0% 5 min: 1,45% 15 min: 2,9% 40 min: 4,35% 110 min: 5,8%	(SBROGGIO et al., 2016)
Proteína de amendoim	Alcalase® (pH 8,0; 50 °C; [E/S] 1/10 (p/p)	Tempo de hidrólise: 22 h Inativação: 90 °C/10 min	0,5 h: 10,8% 2,0 h: 20,6% 6,0 h: 30,2% 22 h: 40,0%	(JAMDAR et al., 2010)
Proteína de Chocos (<i>Sepia officinalis</i>)	Alcalase®: pH 8; T = 50 °C; [E/S] 3U/mg <i>B. licheniformis</i> NH1 (pH 10; T = 50 °C; [E/S] 3U/mg)	Tempo de hidrólise: 240 min Inativação: 80 °C/20 min	Alcalase®: 12,5% <i>B. licheniformis</i> NH1: 15%	(BALTI et al., 2011)
Proteína de feijão preto	Pepsina: pH 2; T = 37 °C; [E/S] 1/20 (p/p) Alcalase®: pH 7; T = 50 °C; [E/S] 1/20 (p/p)	Tempo de hidrólise: 120 min Inativação: 90 °C/10 min	Pepsina: 27,09% Alcalase®: 11,5 %	(EVANGELH O et al., 2017)
Proteína de linhaça (<i>Linum usitatissimum</i>)	Alcalase®: pH 8,5; T = 60 °C; [E/S] 1:90 (p/p)	Tempo de hidrólise: 180 min	Alcalase®: 17,20%	(SILVA et al., 2017)
Proteína de rohu (ovo) (<i>Lab eo rohita</i>)	Pepsina: pH 2; T = 37 °C; [E/S] 1,5% (p/p) Tripsina: pH 8; T = 37 °C; [E/S] 1,0% (p/p)	Tempo de hidrólise: 180 min Inativação: 85-95 °C/20 min.	Pepsina: 34,0% Tripsina: 21,0%	(CHALAMAI AH et al., 2013)
Proteína Plasmática Suína	Alcalase®: pH = 8; T = 55 °C; [E/S] 2:100 (p/p)	Reação enzimática: 5 h Inativação: 95 °C/5 min	0,5h de reação: 6,2%; 2h de reação: 12,7%; 5h de reação: 17,6%	(LIU et al., 2010)
Proteínas sarcoplasmáticas de peito de bovino	Papaína: pH 7; T = 37 °C; [E/S] 1/100 (p/v); 300 rpm.	Tempo de hidrólise: 24h Inativação: 99°C/5 min.	-	(DI BERNARDINI et al., 2012)
Proteína de Soro de Leite	Alcalase®: pH 8; T = 45 °C; [E/S] 1/100 Flavourzyme®: pH 7; T =	Tempo de hidrólise: 3 h Inativação: 85 °C/10 min.	Alcalase®: 11,3%	(DRYÁKOVÁ et al., 2010)

	45 °C; [E/S] 1/100 Neutrase: pH 7; T = 45 °C; [E/S] 1/100 Protamex: pH 6; T= 45 °C; [E/S] 1/100		Flavourzyme®: 35,2% Neutrase: 5,6% Protamex:6,1%	
Polvo (<i>Octopus vulgaris</i>)	Esperase comercial (OPH-Esp): pH 9, T = 50 °C; [E/S] 1:3 (U/mg) Extrato de protease alcalina de blenny de zebra (<i>Salaria basilica</i>) (OPH-ZB): pH 8, T = 45 °C; [E/S] 1:3 (U/mg) <i>Bacillus subtilis</i> A26 (OPH-A26): pH 8, T = 45 °C; [E/S] 1:3 (U/mg)	Tempo de hidrólise: 480 min Inativação: 80 °C/20 min	OPH-Esp: 18,0% OPH-ZB: 17,6% OPH-A26: 21,0%	(BEN SLAMA-BEN SALEM et al., 2017)
Sementes de data (<i>P. dactylifera</i> L.)	Alcalase®: pH 8; T = 50 °C; [E/S] 0.3 AU/g Flavourzyme®: pH 7; T = 50 °C; [E/S] 50 LAPU/g Thermolysin: pH 8; T = 50 °C; [E/S] 50 U/mg	Tempo de hidrólise: 1, 2 e 3 h Inativação: redução para pH 5 com HCl 4M	Alcalase®:13,14 % Flavourzyme®: 12,01% Thermolysin: 11,49%	(AMBIGAIPA LAN; AL-KHALIFA; SHAHIDI, 2015)
Semente de melancia (<i>Citrullus lanatus</i> L.)	Pepsina: pH 2,2; T = 37 °C; [E/S] 1:100 Tripsina: pH 8; T = 37 °C; [E/S] 1:100 Alcalase®: pH 8; T = 60 °C; [E/S] 1:100	Tempo de hidrólise: 5 h Inativação: 95-100 °C/15 min	Pepsina: 19,38% Tripsina: 26,26% Alcalase®: 13,16%	(ARISE; YEKEEN; EKUN, 2016)
Soro de leite de cabra	Alcalase®: pH 7,8; T = 55 °C; [E/S] 1:200 p/p	Tempo de hidrólise 240 min Inativação: 80°C/20 min	60 min: 12% 120 min: 19% 180 min: 25% 240 min: 28%	(OSMAN et al., 2016)
Soja verde (<i>Glycine max</i>)	Alcalase®: pH 8, T = 60 °C, [E/S] 1:50 (p/p) Bromelaína: pH 6,5, T = 45 °C, [E/S] 1:50 (p/p) Flavourzyme®: pH 8, T = 55 °C, [E/S] 1:50 (p/p) Papaína: pH 6,5, T = 70 °C, [E/S] 1:50 (p/p)	Tempo de hidrólise: 10 h	Alcalase®: 36,45%, Bromelina: 61,60% Flavourzyme®: 12,89% Papaína: 15,14%	(HANAFI et al., 2018)
Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	Alcalase®: pH 5,8-6,1; T = 50 °C-64 °C; [E/S] 0,2% (p/p)	Tempo de hidrólise: 240 min Inativação: 90°C/10 min	40 min: 19,50% 80 min: 21,52% 120 min: 23,53% 160 min: 24,85% 200 min: 26,13% 240 min: 25,72%	(BERDARDI et al., 2016)
Torta de Semente de <i>Camellia oleífera</i>	Flavourzyme®: pH = 6; T = 50 °C; [E/S] 2:100 (p/p) Tripsina: pH 8; T= 50 °C; [E/S] 2:100 (p/p) Neutrase: pH 7; T = 45 °C; [E/S] 2:100 (p/p) Papaína: pH 6,5; T = 55 °C; [E/S] 2:100 (p/p) Alcalase®: pH 8,5; T= 55 °C; [E/S] 2:100 (p/p)	Tempo de hidrólise: 5h Inativação: 100 °C/10 min	Em 5h de hidrólise: Alcalase® (31,25%), Flavourzyme® (11,32%), Tripsina (25,44%), Neutrase (21,92 %) e Papaína (22,13%)	(LI et al., 2015)

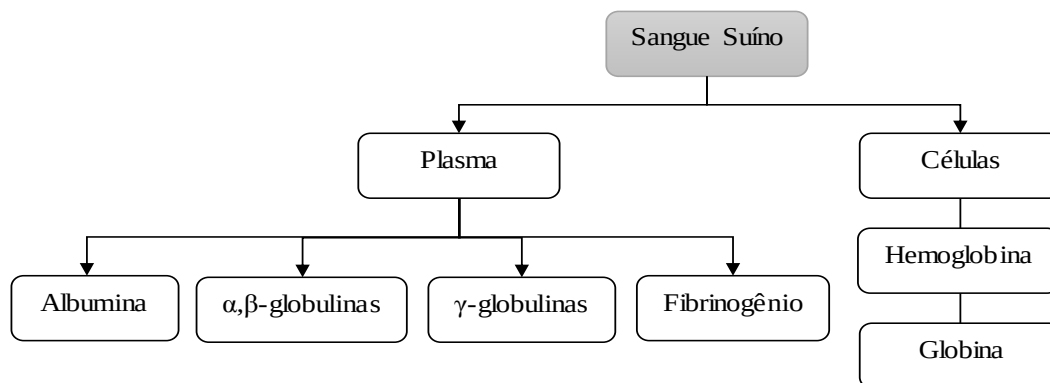
Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

3.2 PLASMA SUÍNO

A fim de produzir alimentos com alto valor nutricional, bem como, com propriedades funcionais melhoradas, a indústria de alimentos vêm utilizando diversos subprodutos proteicos e o processo de hidrólise enzimática para sua obtenção. As proteínas plasmáticas (albumina e imunoglobulinas) e a hemoglobina do sangue suíno, por exemplo, podem ser recuperadas dos resíduos dos matadouros para tais aplicações (ÁLVAREZ et al., 2012).

As proteínas do sangue recebem o tratamento de separação e purificação, para separar o plasma (fração líquida do sangue) da fração celular, como pode ser visualizado na Figura 1. Quase todas as proteínas presentes no sangue são localizadas nas frações plasmáticas, exceto a hemoglobina, a proteína majoritária localizada na fração celular (TYBOR; DILL; LANDMANN, 1975). O sangue animal contém 60% a 70% do plasma e 30% a 40% de glóbulos vermelhos suspensos, em massa. Destes dois componentes, as proteínas plasmáticas contêm albumina (50% a 60%), globulinas (40% a 50%) e fibrinogênio (1% a 3%). Já a fração de células vermelhas contém 28-38% de globina, como o principal componente proteico (HOWELL; LAWRIE, 1987).

Figura 1 – Composição do sangue suíno (plasma e fração celular).



Fonte: Álvarez et al. (2009).

Das duas frações de sangue, o plasma e seus derivados são mais amplamente utilizados na indústria alimentícia devido ao seu sabor e cor mais neutros, facilitando a incorporação nos alimentos sem alterar as propriedades sensoriais do produto final, como pode ser observado na Figura 2. Já a cor marrom escura que a hemoglobina confere às formulações de alimentos restringe mais seu uso como matéria-prima ou ingrediente (HOWELL; LAWRIE, 1987).

Figura 2 – Plasma suíno seco utilizado no estudo.



Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

Os principais aminoácidos presentes no plasma suíno estão listados na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição de aminoácidos de plasma suíno seco.

Aminoácidos	Plasma (g/100 g de proteína)	
	(Tybor; Dill; Landmann, 1975)	(Fagundes; Kempka, 2014)
Essencial		
Lisina	9,2	4,1
Treonina	6,3	5,4
Metionina	1,0	1,0
Valina	7,0	5,2
Fenilalanina	5,6	4,5
Leucina	10,1	7,3
Isoleucina	2,9	2,8
Triptofano	1,9	0,0*
Histidina	3,5	4,1
Não Essencial		
Arginina	5,0	5,2
Ácido aspártico	10,7	5,5
Serina	5,5	5,0
Ácido Glutâmico	13,7	7,7
Prolina	3,8	4,7
Glicina	3,6	3,8
Alanina	5,3	4,6
Cisteína	1,2	2,1
Tirosina	3,6	4,4

* O triptofano não está presente devido à sua possível degradação na etapa de hidrólise empregada no método adotado para obtenção do perfil de aminoácidos

Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

A indústria da carne utiliza a maior parte das proteínas do sangue como ingredientes na indústria alimentícia, principalmente como ligantes, mas também como intensificadores de cor naturais, emulsificantes, substitutos da gordura e agentes de cura da carne (DÀVILA et al., 2007a; LAFARGA; ÁLVAREZ; HAYES, 2017; LEE; SONG, 2009)

Ainda, o sangue suíno é utilizado pela indústria como ingrediente proteico, como aditivo alimentar e suplemento dietético. Alguns exemplos da sua utilização são: Fibrimex® (trombina

e proteína isolada de fibrinogênio) atuando como aglutinante, Plasma Powder FG® (plasma com aumento da concentração de fibrinogênio), atuando como aglutinante de produtos cárneos, Harimix® (hemoglobina estabilizada) para coloração de produtos cárneos, hemoglobina (hemoglobina congelada ou em pó) para coloração natural de produtos de carne, Prietin® (sangue total suíno seco por pulverização) usado como emulsificante, gelificante, aglutinante e corante em salsichas, carnes curadas e patês, AproRed® (hemoglobina estabilizada) para coloração de produtos cárneos, Aprofer 1000® (polipeptídeo de ferro hemo) usado na suplementação de ferro e Plasma (líquido, pó, congelado ou em flocos) gelificante e aglutinante em produtos cárneos (BAH et al., 2013; NUTHONG; BENJAKUL; PRODPRAN, 2009).

As proteínas do sangue têm potencial como substituto de gordura em produtos cárneos, contribuindo com proteínas solúveis e, ao mesmo tempo, reduzindo custos. Estas, reduzem o conteúdo calórico dos alimentos, uma vez que as proteínas contêm menos calorias que a gordura. Além disso, as proteínas do sangue são um produto natural e, portanto, alinhadas com as demandas atuais dos consumidores por alimentos naturais. O plasma sanguíneo e as proteínas isoladas do sangue são usados como ligantes na indústria da carne. O plasma funciona como aglutinante em sistemas de carne devido à sua capacidade de formar géis após o aquecimento, enquanto os desempenhos das proteínas plasmáticas são comparáveis, se não superiores, a outros ligantes (BAH et al., 2016; DÁVILA et al., 2007b; HOU et al., 2017)

Em muitos países europeus e asiáticos, o sangue é usado para preparar pudins de sangue, linguiças de sangue, pão, biscoitos, bolo de sangue e coalhada de sangue. Também é usado em produtos não alimentícios, fertilizante e ração animal. Assim, as proteínas do sangue, abundantes, baratas, prontamente disponíveis, têm um bom perfil de aminoácidos para serem utilizadas em diversas aplicações (BAH et al., 2016; HOU et al., 2017; PÉREZ-GÁLVEZ et al., 2011; WEI; CHIANG, 2009).

Embora a indústria da carne continue a ser a usuária predominante das proteínas do sangue, outros setores da indústria alimentícia também as utilizam na produção de itens como suplementos alimentares e alimentos funcionais, suplementos proteicos, suplementos de ferro. Restrições religiosas, bem como a percepção negativa do consumo de sangue pelo consumo direto também contribuíram para seu uso limitado em aplicações de alimentos, porém esta fonte vêm sendo ativamente estudada como uma fonte potencial de peptídeos bioativos (LAFARGA et al., 2017).

3.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os peptídeos que possuem atividade antimicrobiana geralmente têm menos de 50 aminoácidos, dos quais quase 50% são hidrofóbicos e massa molecular abaixo de 10 kDa. Esses peptídeos podem ser gerados *in vitro* por hidrólise enzimática (SHAHIDI; ZHONG, 2008). Além disso, quase todos os peptídeos antimicrobianos têm funções bactericidas ou bacteriostáticas contra várias cepas Gram-negativas e Gram-positivas (SU, 2011). A atividade antimicrobiana pode variar dependendo da origem e tamanho dos peptídeos, composição de aminoácidos, carga elétrica, hidrofobicidade e estrutura secundária dos peptídeos (SHAHIDI; ZHONG, 2008).

Peptídeos antimicrobianos possuem potencial aplicação na conservação de alimentos e para fins terapêuticos. Tem-se notado que, nos últimos anos, houve excessivo uso de antibióticos na medicina humana e veterinária para reduzir os patógenos, levando ao fenômeno de bactérias multirresistentes (MILAN, Z. et al., 2014). A resistência aos medicamentos antimicrobianos tornou-se um problema para os ambientes hospitalares e um desafio significativo às atuais terapias antimicrobianas, surgindo a necessidade de desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos (BAIG et al., 2014; SHAIKH et al., 2015).

As principais vantagens de peptídeos antimicrobianos comparados com conservantes químicos incluem a menor intensidade de tratamento térmico requerido (processamento mínimo) e retenção das propriedades organolépticas e nutricionais dos alimentos. Em aplicações terapêuticas, os peptídeos antimicrobianos são superiores aos antibióticos bactericidas convencionais, pois eliminam as bactérias mais rapidamente e não são afetados por mecanismos de resistência a antibióticos (MINE; LI-CHAN; JIANG, 2010).

Um dos métodos para testar a atividade antimicrobiana de hidrolisados ou peptídeos inclui o ensaio de difusão em ágar (ou ensaio de zona de inibição), que quantifica a capacidade de um composto para inibir o crescimento bacteriano. Nessa técnica podem ser testadas diferentes concentrações do hidrolisado peptídico. O composto em estudo é colocado em poços ou discos de papel filtro previamente esterilizados, e estes são depositados em ágar previamente inoculado com as bactérias teste. A difusão do composto de estudo destas fontes no meio, leva à inibição do crescimento bacteriano com à formação de zonas de inibição bem visíveis (BONEV; HOOPER; PARISOT, 2008).

Outro método é a determinação da concentração mínima inibitória (MIC). O resultado deste teste define a menor concentração de um antimicrobiano que inibe 100% do crescimento de um micro-organismo, e é geralmente determinada pela inibição do crescimento líquido em um método de espectrometria de 96 poços (DI BERNARDINI et al., 2011; NAJAFIAN; BABJI,

2012). A atividade antimicrobiana de peptídeos de diversas fontes vem sendo determinada contra uma variada gama de micro-organismos como pode ser observado no Quadro 2.

Quadro 2 - Proteínas utilizadas para obtenção de peptídeos com atividade antimicrobiana, contra diversas cepas de micro-organismos e os resultados obtidos.

Fonte da Proteína	Enzima(s)	Micro-organismo(s)	Metodologia	Resultado	Referência
Soro de leite cabra	Alcalase®	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923, <i>Bacillus cereus</i> ATCC 33018, <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028 e <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	Ensaio de difusão em disco e MIC	<i>S. typhimurium</i> : 22,3 mm e 0,44 mg.mL ⁻¹ <i>E. coli</i> : 18,0 mm e 0,95 mg.mL ⁻¹ <i>B. cereus</i> : 13,3 mm e 1,20 mg.mL ⁻¹ <i>S. aureus</i> : 15,0 mm e 0,09 mg.mL ⁻¹	(OSMAN et al., 2016)
Caseína de leite de camelo	Alcalase®, Papaína, α -Quimotripsina	<i>Escherichia coli</i> (MTCC No. 2991), <i>Bacillus cereus</i> (MTCC No. 6728), <i>Staphylococcus aureus</i> (MTCC No. 7443) e <i>Listeria monocytogenes</i> (MTCC No. 657)	Ensaio de difusão em disco	<i>S. aureus</i> para Alcalase® foi de 14,88 mm, α -Quimotripsina 19,11 mm e Papaína 12,46 mm. <i>E. coli</i> para Alcalase® foi de 17,93 mm, α -Quimotripsina 17,62 mm e Papaína 14,20 mm <i>L. monocytogenes</i> para Alcalase® foi de 15,52 mm, α -Quimotripsina 16,32 mm e Papaína 15,12 mm <i>B. cereus</i> para Alcalase® foi de 18,95 mm, α -Quimotripsina 17,65 mm e Papaína 13,13±0,29 mm	(KUMAR et al., 2016)
Bagaço de malte cervejeiro	Cepa de <i>B. cereus</i>	<i>L. monocytogenes</i> e <i>E. coli</i> O157:H7	Ensaio de difusão em disco com as amostras de hidrolisado coletadas em 0, 2, 8 e 24 h	<i>L. monocytogenes</i> HP ₀ <10 mm, HP ₂ 12,5 mm, HP ₈ 15,17 mm e HP ₂₄ 26,67 mm <i>E. coli</i> O157:H7 HP ₀ <10 mm, HP ₂ <10 mm, HP ₈ <10 mm e HP ₂₄ <10 mm	(KOTLAR; PONCE; ROURA, 2013)
Fração de hemácia de bovinos, suínos, ovinos e veados	Proteases fúngicas (FP400 e FPII)	<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Leitor de microplacas de 96 poços, a 600 nm	FP400 e FPII para <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> (40 mg.mL ⁻¹); FP400 e FPII para <i>P. aeruginosa</i> (50 mg.mL ⁻¹)	(BAH et al., 2015b)
Plasma de veados, carneiros e suínos	Protease de fontes de plantas (papaína e	<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus</i>	Leitor de microplacas de 96 poços, a 600 nm	Não foi detectada atividade antimicrobiana nos hidrolisados	(BAH et al., 2015a)

	bromelina) e fúngicas (FP400 e FPII)	<i>aureus</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>			
Plasma Bovino	Protease de fontes de plantas (papaína e bromelina) e fúngicas (FP400 e FPII)	<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Leitor de microplacas de 96 poços, a 600 nm	Nenhum dos hidrolisados demonstrou atividade antimicrobiana	(BAH et al., 2016)
Torta de dendê	Alcalase®	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778, <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 11774, <i>Bacillus thuringiensis</i> ATCC 10792 e <i>Lysinibacillus sphaericus</i> ATCC 4525, <i>Clostridium perfringens</i> IMR-C438	MIC	<i>B. cereus</i> : 200 µg.mL ⁻¹ <i>B. subtilis</i> : 450 µg.mL ⁻¹ <i>B. thuringiensis</i> : 150 µg.mL ⁻¹ <i>Lysinibacillus sphaericus</i> : 150 µg.mL ⁻¹ <i>Clostridium perfringens</i> : 250 µg.mL ⁻¹	(TAN; AYOB; YAACOB, 2013)

Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

3.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Um processo vital em organismos aeróbicos, particularmente em vertebrados e humanos é a oxidação, processo esse que leva a formação de radicais livres. A formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), incluindo radicais livres, como radicais ânion superóxido (O_2^-), radicais hidroxila ($OH^\bullet$) e espécies de radicais livres, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio singlete (O_2), é uma consequência inevitável no uso normal do oxigênio pelo organismo durante a respiração (DI BERNARDINI et al., 2011).

No caso dos alimentos, a oxidação, por exemplo de proteínas, é afetada pela oxidação lipídica. Carboidratos são menos sensíveis à oxidação do que lipídios e proteínas. A relação da formação de ROS com doenças tais como doenças cardíacas, acidente vascular cerebral, arteriosclerose, diabetes e câncer se mostram cada vez mais relacionadas (BAIG et al., 2018; DI BERNARDINI et al., 2011).

Antioxidantes podem proteger o corpo humano dos efeitos dos radicais livres e ROS, retardando o progresso de muitas doenças crônicas, assim como a peroxidação lipídica. Os antioxidantes também podem auxiliar no aumento da estabilidade dos lipídeos, sendo utilizados como conservantes em alimentos e cosméticos. Além disso, são amplamente utilizados em suplementos dietéticos para melhorar a saúde e reduzir o risco de doenças como câncer e doenças coronarianas (LORENZO et al., 2018; TAVANO, 2013).

A busca por antioxidantes alimentares naturais está em constante crescimento, visando uma alternativa aos antioxidantes sintéticos e que tragam benefícios à saúde com pouco ou nenhum efeito colateral (DI BERNARDINI et al., 2011). Peptídeos antioxidantes naturais são derivados da hidrólise de proteínas, realizada por enzimas de origem animal, microbiana ou vegetal (Alcalase®, Ficina, Flavourzyme®, Neutrase, Papaína, Pepsina, Pronase e Termolisina), que quebram as ligações peptídicas formando pequenos peptídeos. Tais ligações são quebradas por hidrólise e a densidade de carga aumenta enquanto o tamanho molecular diminui (UDENIGWE; ALUKO, 2012).

A maioria dos peptídeos com atividade antioxidante, extraídos de fontes alimentares, apresenta massas moleculares variando de 500 a 1800 Da e contêm resíduos de aminoácidos hidrofóbicos como Leu ou Val no terminal N dos peptídeos, e Tyr, Lys, His, Trp, Pro e Met dentro de suas sequências (KIM et al., 2009).

Os antioxidantes são substâncias que em pequenas quantidades são capazes de retardar a oxidação das células, evitando ao mesmo tempo o acúmulo excessivo de radicais livres ou espécies reativas de oxigênio (ROS). Diversas doenças degenerativas têm sido associadas aos radicais livres, que são gerados por processos fisiológicos que ocorrem naturalmente no corpo e por fontes externas, como a exposição excessiva à luz solar ou ao fumo (UDENIGWE; ALUKO, 2012).

Isoladamente, tais processos fisiológicos não podem não ser prejudiciais, porém o excesso de produção de radicais livres pode levar ao comprometimento do sistema imunológico. O estresse oxidativo também tem sido associado a doenças cardiovasculares, hipertensão, câncer e outras doenças. Antioxidantes peptídicos têm estruturas mais simples do que suas proteínas parentais, conferindo maior estabilidade e exibindo propriedades nutricionais e funcionais, além de sua atividade antioxidante (LI et al., 2015). A atividade antioxidante de diversas fontes vem sendo estudadas como pode ser observado no Quadro 3.

Quadro 3 - Proteínas utilizadas para obtenção de peptídeos com atividade antioxidante.

Fonte da Proteína	Enzima(s)	Metodologia	Resultado	Referência
Caseína de leite de camelo	Alcalase®, α -Quimotripsina e Papaína	DPPH (100 μ M) lida a 517 nm	Alcalase®: 32,25% α -Quimotripsina: 37,65% Papaína: 28,38%	(KUMAR et al., 2016)
		ABTS em sulfato de potássio (2,45 mM), medida a 734 nm	Alcalase®: 79,69% α -Quimotripsina: 91,28% Papaína: 70,90%	
		FRAP 593 nm	Alcalase®: 20,38 mM.ml ⁻¹ α -Quimotripsina: 24,58 mM.ml ⁻¹	

			Papaína: 18,83 mM.mL ⁻¹	
Colágeno da pele da Cavala espanhola (<i>Niphonius scomberomorus</i>)	Pepsina	DPPH (0,02%) foi determinada a partir de sete frações de hidrolisados (F1 a F7) na concentração de 5,0 mg.mL ⁻¹ a 517 nm	F7: 65,72%; F1: 35,82% EC ₅₀ F1: 8,95 mg.mL ⁻¹ EC ₅₀ F2: 8,44 mg.mL ⁻¹ EC ₅₀ F3: 7,62 mg.mL ⁻¹ EC ₅₀ F4: 7,08 mg.mL ⁻¹ EC ₅₀ F5: 4,51 mg.mL ⁻¹ EC ₅₀ F6: 2,39 mg.mL ⁻¹ EC ₅₀ F7: 1,57 mg.mL ⁻¹	(CHI et al., 2014)
		FRAP 700 nm (x 10 ⁻¹)	F1: 1,26 (5 mg.mL ⁻¹) F2: 1,26 (5 mg.mL ⁻¹) F3: 1,25 (5 mg.mL ⁻¹) F4: 1,30 (5 mg.mL ⁻¹) F5: 1,48 (5 mg.mL ⁻¹) F6: 1,59 (5 mg.mL ⁻¹) F7: 2,87 (5 mg.mL ⁻¹)	
Feijão azufrado (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Alcalase®, Termolisina e Pancreatina	DPPH (100 mmol/L) lida a 515 nm	Azufrado Higuera (Alcalase® 44,05%, Termolisina 32,16%, Pancreatina 33,90%) a 1 mg.mL ⁻¹ ; Azufrado Noroeste (Alcalase® 33,59%, Termolisina 31,03%, Pancreatina 23,61%) a 1 mg.mL ⁻¹ ; Azufrado Regional '87 (Alcalase® 35,81%, Termolisina 34,03%, Pancreatina 28,21%) a 1 mg.mL ⁻¹ ;	(VALDEZ-ORTIZ et al., 2012)
		ABTS e persulfato de potássio (2,45 mmol) lida a 734 nm	Azufrado Higuera (Alcalase® 73,4%, Termolisina 58,6%, Pancreatina 69,4%) a 0,25 mg.mL ⁻¹ ; Azufrado Noroeste (Alcalase® 77,2%, Termolisina 50,2%, Pancreatina 50,2%) a 0,25 mg.mL ⁻¹ ; Azufrado Regional 87 (Alcalase® 99,9%, Termolisina 57,5%, Pancreatina 75,3%) a 0,25 mg.mL ⁻¹ ;	
Hemoglobina suína	Alcalase® e Flavourzyme®	DPPH (1 mM) lida a 517 nm	Sem hidrólise: 21,53% Alcalase®: 4 h (51,57%); 10 h (48,55%) Flavourzyme®: 6 h (-2,81%); 10 h (-10,97%)	(CHANG; WU; CHIANG, 2007)
		FRAP 700 nm	Sem hidrólise: 0,38 Alcalase®: 4 h (0,21); 10 h (0,17) Flavourzyme®: 6 h (0,08); 10 h (0,10)	
Hemoglobina suína	Pepsina	DPPH (1 mM) lida a 517 nm	83,0 % a 2 mg.mL ⁻¹	(SUN; LUO, 2011)
		FRAP 700 nm	0,66 a 1 mg.mL ⁻¹	
Hemoglobina Suína	Alcalase®, Flavourzyme®, Papaína, Pepsina e Tripsina.	DPPH (1 mM) medida a 517 nm	Alcalase®: 27,77% Flavourzyme®: 3,10% Papaína: 18,58% Pepsina: 67,0% Tripsina: 23,03%	(SUN; SHEN; LUO, 2011)

Músculo do peito de bovino (<i>B. taurus</i>)	Papaína	DPPH (0,15088 mM) lida a 515 nm	Papaína: 18,68% a 1 mg.mL ⁻¹	(DI BERNARDINI et al., 2012)
		ABTS (7 mM) e persulfato de potássio (2,45 mM) lida a 734 nm	P3: 41,85%, P2:37,66% e P1: 31,25%	
		FRAP 593 nm	8,61 µg a 5 mg.mL ⁻¹	
Okara	Alcalase® e Flavourzyme®	DPPH (250 µM) lida a 515 nm	Alcalase®: 17,7% Flavourzyme: 18,5%	(SBROGGIO et al., 2016)
		ABTS (7 mM) e persulfato de potássio (2,45 mM) lida a 730 nm	Alcalase®: 99,5% Flavourzyme 88,2%	
		FRAP 595 nm	Alcalase®: 684,9 µM Trolox Flavourzyme: 360,3 µM Trolox	
Ovas de Carpas (<i>Cyprinus carpio</i>) comuns	Pepsina, Tripsina e Alcalase®.	DPPH (0,15 mM) medida a 517 nm	EC ₅₀ Pepsina: 2,255 mg.mL ⁻¹ EC ₅₀ Tripsina: 1,158 mg.mL ⁻¹ EC ₅₀ Alcalase®: 1,115 mg.mL ⁻¹	(CHALAMAIAH et al., 2015)
		ABTS (7,4 mM) em persulfato de potássio (2,6 mM), medida a 734 nm	EC ₅₀ Pepsina: 0,235 mg.mL ⁻¹ EC ₅₀ Tripsina: 0,186 mg.mL ⁻¹ EC ₅₀ Alcalase®: 0,301 mg.mL ⁻¹	
		FRAP 700 nm	Pepsina: 0,43 em 5 mg.mL ⁻¹ Tripsina: 0,77 em 5 mg.mL ⁻¹ Alcalase®: 0,78 em 5 mg.mL ⁻¹	
Plasma bovino	Proteases vegetais (Papaína, Bromelina) e proteases fungícas (FP400 e FPII)	DPPH lida a 517 nm.	Papaína (41,0%), Bromelina (36,83%), FP400 (56,88%) e FPII (75,6%)	(BAH et al., 2016)
Plasma Suíno	Alcalase®	DPPH (1×10 ⁴ M) medida a 517 nm	DH 0%: 21,72% DH 6,2%: 31,3% DH 12,7%: 45,4% DH 17,6%: 76,8%	(LIU et al., 2010)
Plasma de veados, ovelhas e suínos	Plantas (papaína e bromelina) e fúngicas (FP400 e FPII).	DPPH lida a 517 nm.	FPII: 64,5%, 63,3% e 55,2% FP400: 55,08%, 55,08% e 51,95% Bromelina: 23,44%, 26,95% e 28,52% Papaína: 30,47%, 28,12%, 28,91%	(BAH et al., 2015a)
Proteína de Canola	Alcalase® e Flavourzyme®	DPPH (50 pM) medida a 517 nm	Alcalase®: (28,9% a 2,5 mg.mL ⁻¹); (48,7% a 5,0 mg.mL ⁻¹); (70,2% a 10 mg.mL ⁻¹) Flavourzyme®: (34,8% a 2,5 mg.mL ⁻¹); (52,1% a 5,0 mg.mL ⁻¹); (73,2% a 10 mg.mL ⁻¹) Alcalase+Flavourzyme®: (30,1% a 2,5 mg.mL ⁻¹); (48,01% a 5,0 mg.mL ⁻¹); (69,1% a 10 mg.mL ⁻¹)	(CUMBY et al., 2008)
		FRAP (x 10 ³) 700 nm	Alcalase®: (20,2 a 2,5 mg.mL ⁻¹); (61,4 a 5,0 mg.mL ⁻¹); (73,4 a 10 mg.mL ⁻¹)	

			Flavourzyme®: (39,1 a 2,5 mg.mL ⁻¹); (67,9 a 5,0 mg.mL ⁻¹); (91,7 a 10 mg.mL ⁻¹) Alcalase+Flavourzyme®: (22,8 a 2,5 mg.mL ⁻¹); (43,5 a 5,0 mg.mL ⁻¹); (64,3 a 10 mg.mL ⁻¹)	
Proteína de Chocos (<i>Sepia officinalis</i>)	<i>Bacillus licheniformis</i> NH1 e Alcalase®	DPPH (0,02%) foi medida a 517 nm	<i>Bacillus licheniformis</i> NH1: 71,50% a 2,0 mg.mL ⁻¹ Alcalase®: 66,06% a 2,0 mg.mL ⁻¹	(BALTI et al., 2011)
Proteína de Rohu (ovo) (<i>Labeo rohita</i>)	Pepsina e Tripsina	DPPH (0,15 mM) lida em 517 nm.	Pepsina: (20,3% a 0,5 mg.mL ⁻¹) e (38,0% a 1,0 mg.mL ⁻¹) Tripsina (19,7% a 0,5 mg.mL ⁻¹) e (37,4% a 1,0 mg.mL ⁻¹)	(CHALAMAIAH et al., 2013)
		ABTS (7,4 mM) com persulfato de potássio (2,6 mM) lida a 734 nm	Tripsina: (32% a 0,1 mg.mL ⁻¹) e (91% a 0,5 mg.mL ⁻¹) Pepsina: (37% a 1,0 mg.mL ⁻¹) e (80% a 5,0 mg.mL ⁻¹)	
		FRAP 700 nm	Tripsina: (0,41 a 5 mg.mL ⁻¹) Pepsina: (0,44 a 5,0 mg.mL ⁻¹)	
Polvo (<i>Octopus vulgaris</i>)	Esperase® comercial (OPH-Esp), Extrato de protease alcalina de blenny Zebra (<i>Salaria basilica</i>) (OPH-ZB) e preparação enzimática de <i>Bacillus subtilis</i> A26 (OPH-A26)	DPPH (0,02%) lida a 517 nm	OPH-Esp: 58,52% a 6 mg.mL ⁻¹ OPH-ZB: 53,29% a 6 mg.mL ⁻¹ OPH-A26: 75,1% a 6 mg.mL ⁻¹	(BEN SLAMA-BEN SALEM et al., 2017)
		FRAP 700 nm	OPH-Esp: 1,40 a 5 mg.mL ⁻¹ OPH-ZB: 1,19 a 5 mg.mL ⁻¹ OPH-A26: 1,44 a 5 mg.mL ⁻¹	
Soro de leite	Alcalase®, Flavourzyme, Neutrase e Protamex	ABTS medida a 734 nm	Alcalase®: 54,16% Flavourzyme®: 46,83% Neutrase: 40,0% Protamex: 40,0%	(DRYÁKOVÁ et al., 2010)
Torta de sementes de <i>Camellia oleifera</i>	Flavourzyme®, Tripsina, Neutrase, Papaína, Alcalase®	DPPH (0,15 mM) medida a 517 nm	Flavourzyme®: EC ₅₀ 1,33 mg.mL ⁻¹ Tripsina: EC ₅₀ 2,63 mg.mL ⁻¹ Neutrase: EC ₅₀ 4,39 mg.mL ⁻¹ Papaína: EC ₅₀ 3,85 mg.mL ⁻¹ Alcalase®: EC ₅₀ 3,37 mg.mL ⁻¹	(LI et al., 2015)

Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

3.5 ATIVIDADE ANTI-HIPERTENSIVA

Doenças crônicas relacionadas com o estilo de vida, tais como tabagismo, dieta (frituras, carne vermelha), álcool, exposição ao sol, poluentes ambientais, infecções, estresse, obesidade, sedentarismo e hereditariedade, são responsáveis por milhões de mortes todos os anos e são as principais causas de mortalidade nos países industrializados. Os riscos de tais doenças, as formas de minimizá-los ou preveni-los, são frequentemente discutidos. O tipo mais comum de doença cardiovascular (crônica) é a hipertensão arterial (GALLEGO; MORA; TOLDRÁ, 2018;

HERNÁNDEZ-LEDESMA; DEL MAR CONTRERAS; RECIO, 2011; UDENIGWE; ALUKO, 2012).

Associada a dieta e ao estilo de vida, a hipertensão arterial ocorre quando as paredes das artérias maiores perdem a elasticidade e se tornam mais rígidas, ocasionando um menor espaço para o fluxo sanguíneo, aumentando dessa forma a pressão do fluido. Vasos sanguíneos menores se tornam mais estreitos com a idade, agravando os efeitos (AHHMED; MUGURUMA, 2010; GALLEGO; MORA; TOLDRÁ, 2018; SAADI et al., 2015).

Drogas sintéticas como o Captopril® e Analapril® inibem a atividade da ECA por ligação ao sítio ativo da enzima, diminuindo a pressão sanguínea, sendo na maioria dos casos tratada de maneira não específica, porque é de tipo desconhecido ou é diagnosticada em estágio avançado. Além disso, esses medicamentos apresentam efeitos colaterais incluindo tosse, perturbação do paladar, erupções cutâneas e angioedema, e em substituição tem sido relatados peptídeos bioativos como alternativas promissoras (AHHMED; MUGURUMA, 2010; TANZADEHPANAH et al., 2013, 2016).

O interesse por peptídeos bioativos surge como uma alternativa, pois além de possuírem compostos bioativos e ingredientes nutracêuticos, também demonstram ter benefícios fisiológicos que reduzem o risco de doenças crônicas e complicações, além de suas funções nutricionais básicas (TAVANO, 2013).

Entre os peptídeos bioativos, os peptídeos inibidores da enzima conversora da angiotensina I (ECA) derivados de proteínas alimentares, que possuem sequências relativamente curtas, contendo de 2 a 12 aminoácidos, têm atraído atenção especial e têm sido estudados de forma mais abrangente por sua capacidade de prevenir a hipertensão (LAFARGA; HAYES, 2014).

Dentro do sistema renina-angiotensina (RAS), a enzima protease renina é a etapa limitante da taxa de conversão do angiotensinogênio em uma série de hormônios peptídicos da angiotensina. Espécies reativas de oxigênio (EROs) causam oxidação de angiotensinogênio e formação de ponte dissulfeto entre os grupos tiol (SH) de seus resíduos C18 e C138. Isso resulta em uma mudança conformacional que torna os locais de clivagem da angiotensina acessíveis à renina, levando à formação da angiotensina-I (DI BERNARDINI et al., 2012).

A ECA (EC 3.4.15.1) é uma dipeptidil peptidase e cliva primeiramente um decapeptídeo angiotensina-I (Asp-Arg-Val-Tyr-His-Pro-Phe-His-Leu) a um octa-peptídeo angiotensina-II (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe), que é um potente vasoconstritor. A ECA também inativa a função dilatacional da bradicinina. A angiotensina-II aumenta a pressão arterial ao contrair artérias. Os inibidores da ECA inibem a formação de angiotensina II,

relaxando as artérias, permitindo mais flexibilidade e reduzindo a pressão arterial (ERDÖS; TAN; SKIDGEL, 2010; FURUTA et al., 2016). A pressão arterial é normalizada com a inativação da ECA, que estabiliza a angiotensina-I. Os peptídeos que inibem a ECA ligam-se em tal local clivando a angiotensina. Se a competição for forte, a inibição da ECA previne a constrição das artérias (AHHMED; MUGURUMA, 2010).

Os peptídeos inibidores da ECA são normalmente constituídos por dois a 12 aminoácidos e contêm normalmente resíduos hidrofóbicos (Phe, Trp, Tyr, Pro) na sequência tripeptídica C-terminal. Isso aumenta a interação do peptídeo com as três zonas hidrofóbicas colocadas no sítio ativo da enzima (LI et al., 2004).

Um fator importante que afeta a atividade inibitória é a propriedade hidrofílica-hidrofóbica do peptídeo. A propriedade hidrofílica, comumente dá origem a uma atividade mais fraca ou nenhuma atividade, porque torna o peptídeo inacessível ao sítio ativo da ECA. Para uma atividade inibitória elevada, é necessário que o aminoácido seja hidrofóbico. É importante ressaltar que os estudos de correlação de estrutura-atividade em peptídeos inibidores da ECA são baseados apenas na análise da sequência de aminoácidos (LI et al., 2004; LICEAGA; HALL, 2018). No Quadro 4 é possível verificar a capacidade inibitória da ECA de vários hidrolisados proteicos.

Quadro 4 - Proteínas utilizadas para obtenção de peptídeos inibidores da enzima conversora da angiotensina, metodologias utilizadas para a determinação e os resultados obtidos.

Fonte da Proteína	Enzima(s)	Metodologia	Resultado	Referência
Caseína bovina	Pepsina	ECA (2 mU) e HHL (5 mM) lida a 228 nm	EC ₅₀ caseína bovina: > 1000 µg.mL ⁻¹ EC ₅₀ caseína bovina hidrolisada: 52,8 µg.mL ⁻¹ EC ₅₀ caseína bovina permeada < 3000 Da: 5,5 µg.mL ⁻¹	(MIGUEL et al., 2009)
Caseinato de sódio	Papaína, Pancreatina e Tripsina	ECA (25 mU.mL ⁻¹) e HHL (8,3 mM) lida a 228 nm	Papaína (66,78%), Pancreatina (41,03%) e Tripsina (65,57%)	(LUO; PAN; ZHONG, 2014)
Clara de ovo de avestruz	Tripsina	ECA (50 mU.mL ⁻¹) e FAPGG (0,5 mM) lido a 340 nm	Tripsina: 45% após 10h	(TANZADE HPANAH et al., 2013)
Colza	Alcalase®, Proteinase K, Pepsina, Pancreatina, Termolisina, Flavourzyme®	ECA (1 U.mL ⁻¹) e FAPGG (0,5 mM) lida a 345 nm	Alcalase®: 76,92% Proteinase K: 83,76% Pepsina+Pancreatina: 52,14%, Termolisina: 84,19% Flavourzyme®: 46,15%	(HE et al., 2013)
Farinha de <i>Jatropha curcas</i> isolada	Alcalase®, Pepsina e Pancreatina	ECA (100 mU.mL ⁻¹) e HHL lida a 382 nm.	Alcalase®: EC ₅₀ 2,8 mg.mL ⁻¹ Pepsina-Pancreatina: EC ₅₀ 7,0 mg.mL ⁻¹	(MARRUFO -ESTRADA et al., 2013)

Feijão Azufrado (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Alcalase®, Termolisina e Pancreatina	ECA (2,5 mU.mL ⁻¹) e HHL lida a 228 nm	Alcalase® EC ₅₀ (0,19 ug.mL ⁻¹ , 0,45 ug.mL ⁻¹ e 1,30 ug.mL ⁻¹); Termolisina EC ₅₀ (0,11 ug.mL ⁻¹ , 0,35 ug.mL ⁻¹ e 2,78 ug.mL ⁻¹); Pancreatina EC ₅₀ (60,36 ug.mL ⁻¹ , 203,65 ug.mL ⁻¹ e 19,97 ug.mL ⁻¹) para Azufrado Higuera, Azufrado Noroeste e Regional Azufrado '87, respectivamente	(VALDEZ-ORTIZ et al., 2012)
Proteína de gema de ovo	Pepsina	ECA (2 mU) e HHL lida a 228 nm	EC ₅₀ : 623,0 µg.mL ⁻¹	(ZAMBRO WICZ et al., 2015)
Semente de data (<i>P. dactylifera</i> L)	Alcalase® (AL) Flavourzyme® (FL) e Thermolisina (TH)	ECA (0,25 U.mL ⁻¹) e HHL (6 mg.mL ⁻¹) lida a 228 nm	AL: 56,72%; EC ₅₀ 0,97 mg.mL ⁻¹ FL: 32,10%; EC ₅₀ 1,57 mg.mL ⁻¹ TH: 23,51%; EC ₅₀ 2,08 mg.mL ⁻¹ AL + FL: 72,76%; EC ₅₀ 0,69 mg.mL ⁻¹ AL + TH: 94,0%; EC ₅₀ 0,53 mg.mL ⁻¹ FL + TH: 58,95%; EC ₅₀ 0,85 mg.mL ⁻¹ AL + FL + TH: 54,10%; EC ₅₀ 0,93 mg.mL ⁻¹	(AMBIGAIP ALAN; AL-KHALIFA; SHAHIDI, 2015)
Soja verde (<i>Glycine max</i>)	Alcalase®, Bromelaína, Flavourzyme® e Papaína	ECA (100 mU.mL ⁻¹) e HHL (5 mM) lida a 410 nm	Alcalase®: EC ₅₀ 0,13 mg.mL ⁻¹ após 7 h Papaína: EC ₅₀ 0,20 mg.mL ⁻¹ após 5 h Bromelaína: EC ₅₀ 0,36 mg.mL ⁻¹ após 6 h Flavourzyme®: EC ₅₀ 1,14 mg.mL ⁻¹ após 6 h	(HANAFI et al., 2018)
Verdinho (<i>Micromesistius poutassou</i>)	(1) Subtilisina (S), (2) Tripsina (T), e (3) (ST).	ECA (0,25 U.mL ⁻¹) e FAPGG (0,88 mmol.L ⁻¹) lida a 340 nm	S: 172,0 µg.mL ⁻¹ T: 305,33 µg.mL ⁻¹ ST: 626,67 µg.mL ⁻¹	(GARCÍA-MORENO et al., 2016)

ECA: Enzima de conversão da angiotensina; FAPGG: N- [3- (2- Furil) acrilóil] -o- fenilalanil- glicil- glicina; HHL: Hidrato de N-Hippuryl-His-Leu.

Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

A pesquisa de inibidores da ECA *in vitro* é o método mais comum na seleção de potenciais peptídeos anti-hipertensivos derivados de proteínas alimentares. *In vitro*, a atividade inibidora da ECA é geralmente medida monitorando a conversão de um substrato por ECA na presença e ausência de inibidores. Os principais métodos utilizados são baseados em ensaios espectrofotométricos e de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). *Hippuryl-His-Leu* (HHL) e tri-peptídeo *furanocryloil* (FAPGG) têm sido utilizados como substratos. O método espectrofotométrico é baseado na hidrólise de HHL pela ECA ao ácido hipúrico e His-Leu, e a extensão do ácido hipúrico liberado é medida após sua extração com acetato de etila. A potência inibitória é expressa como EC₅₀, ou concentração necessária para inibir 50% da atividade enzimática (CUSHMAN; CHEUNG, 1971; DOIG; SMILEY, 1993; LI et al., 2005; MEHANNA; DOWLING, 1999; VERMEIRSEN; VAN CAMP; VERSTRAETE,

2002) (CUSHMAN; CHEUNG, 1971; DOIG; SMILEY, 1993; LI et al., 2005; MEHANNA; DOWLING, 1999; VERMEIRSEN; VAN CAMP; VERSTRAETE, 2002).

3.6 OUTRAS BIOATIVIDADES

Muitas outras bioatividades ligadas a tratamentos de distúrbios podem ser encontradas na literatura. O *diabetes mellitus*, por exemplo, é um dos distúrbios metabólicos de grande relevância e cuja incidência vem aumentando rapidamente. As principais razões que contribuem para o aumento nos casos, especialmente de diabetes do tipo 2, está relacionada a mudança de estilo de vida associados a maus hábitos alimentares, menos exercícios e envelhecimento (ANGUIZOLA et al., 2013; RAMADHAN et al., 2017).

As principais maneiras para tratar diabetes estão relacionadas ao controle do açúcar no sangue, incluindo mudanças de estilo de vida e os tratamentos com drogas sintéticas, pela ingestão de medicamentos que incluem Biguanidas, Sulfonilureias, Meglitinidas, Tiazolidinedionas, inibidores da DPP-IV, agonistas do receptor GLP-1, inibidores da α -glucosidase, inibidores da α -amilase e inibidores da SGLT-2, porém podem desencadear diversos sintomas clínicos e diversos efeitos colaterais, como náuseas, vômitos, ganho de peso, aumento do risco de doença cardiovascular, infecção do pâncreas e câncer da bexiga. No entanto, estudos vêm sendo voltados na busca de compostos anti-diabéticos a partir de fontes naturais que poderiam atuar como um anti-catalisador para competir com a α -amilase e α -glucosidase prevenindo a hiperglicemia sem efeitos colaterais. A contenção dessas enzimas retarda a absorção de glicose, resultando na inibição da hiperglicemia pós-prandial. Vários estudos com peptídeos bioativos derivados de alimentos através de fontes naturais já estão elucidados e são considerados adequados para inibir a α -amilase e α -glucosidase satisfatoriamente.

Tais enzimas (α -glucosidase (EC 3.2.1.20) e α -amilase (EC 3.2.1.1)) hidrolisam amido e oligossacarídeos durante a digestão. O amido e outros polissacarídeos são hidrolisados pela α -amilase em oligossacarídeos, estes são ainda mais hidrolisados para liberar glicose antes de serem absorvidos. A α -glucosidase, que está presente na mucosa epitelial do intestino delgado, cliva ligações glicosídicas em oligossacarídeos liberando monossacarídeos. A inibição da α -glucosidase retarda e diminui a liberação de glicose livre, diminuindo os níveis de glicose pós-prandial (KIM et al., 2014).

Estudos também demonstraram a eficácia de hidrolisados proteicos com potencial de utilização na dieta de seres humanos (especialmente crianças) que sofrem de alergia alimentar. O potencial da diminuição de alergenicidade de uma proteína depende da seleção adequada de

uma protease e da extensão da hidrólise. Hidrólises bem executadas têm sido utilizadas para diminuir a alergenicidade das proteínas tanto de origem animal (leite de vaca, ovo) quanto vegetal (soja, glúten, amendoim) (FLEISCHER; VENTER; VANDENPLAS, 2016; OSBORN; SINN; JONES, 2017). A alergia as proteínas do leite, por exemplo, pode ser diminuída através da suplementação continuada com uma fórmula de proteína hidrolisada para crianças que não podem ser amamentadas e que possuem alto risco de alergia (OSBORN; SINN; JONES, 2017).

Outra necessidade crescente é por alimentos que possuem ação anticoagulante e antitrombótica. A doença trombótica, pode causar complicações graves, como um infarto intestinal e um aumento da pressão venosa. Esta doença geralmente resulta da coagulação sanguínea, nos vasos (GOTO; TOMITA, 2013). O processo de coagulação do sangue está sujeito a formação de um coágulo de fibrina que resulta da interação entre trombina e fibrinogênio. Se a atividade da trombina é inibida, o coágulo de fibrina não é formado (REN et al., 2014; ZHANG, 2016).

Há estudos envolvendo peptídeos isolados de carne e organismos marinhos, principalmente peixes, que exibem atividade anti-câncer, inibindo a proliferação celular com efeito citotóxico contra células tumorais (NAJAFIAN; BABJI, 2012; RYAN et al., 2011; SHAHIDI; ZHONG, 2008; UDENIGWE; HOWARD, 2013). O câncer é uma das principais causas de mortalidade, com taxas de incidência aumentando em todo o mundo. Embora as causas subjacentes de muitos tipos de câncer ainda não tenham sido totalmente elucidadas, uma grande quantidade de evidências aponta a dieta como um dos principais fatores do risco do seu desenvolvimento. O interesse em descobrir novos peptídeos que possam atuar como agentes anticancerígenos é cada vez maior, devido a sua multifuncionalidade, alta sensibilidade e características de estabilidade (MINE; LI-CHAN; JIANG, 2010).

Peptídeos bioativos derivados de várias fontes de proteína exercem efeitos imunomoduladores em estudos *in vitro* e *in vivo*. Os peptídeos imunomoduladores podem ser liberados naturalmente a partir de proteínas durante o processo de digestão no trato gastrointestinal, gerando assim respostas imunológicas e funções celulares, ou obtidas por hidrólise enzimática *in vitro* antes da administração para conseguir um efeito terapêutico como nutracêuticos (SHAHIDI; ZHONG, 2008).

No caso dos peptídeos opióides, estes agem como hormônios opióides interagindo com receptores específicos nos sistemas nervoso, endócrino e imunológico. Para o tratamento de transtornos mentais, peptídeos bioativos exibem atividades inibidoras do tipo opióide e proil endopeptidase (PEP, EC 3.4.21.26), agindo no sistema nervoso central (SNC) e podendo

provocar efeitos positivos na motivação, comportamento, estresse, controle da ingestão alimentar ou percepção da dor (MARTÍÍNEZ-ALVAREZ, 2013).

CAPÍTULO II

Este capítulo aborda a caracterização da matéria-prima, seguida da avaliação das condições ótimas de hidrólise utilizando uma protease alcalina, por meio de um planejamento experimental visando maximizar o grau de hidrólise, estudo dos parâmetros cinéticos e análise da cor instrumental. Os hidrolisados foram caracterizados por análise do perfil eletroforético empregando a técnica de SDS-PAGE e avaliação estrutural através da análise de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) em diferentes tempos de ensaio. As bioatividades dos hidrolisados, incluindo atividade antimicrobiana, atividade antioxidante (DPPH e FRAP), atividade antidiabética e anti-hipertensiva foram determinadas.

4 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO PLASMA SUÍNO UTILIZANDO UMA PROTEASE ALCALINA E VERIFICAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO GRAU DE HIDRÓLISE NAS BIOATIVIDADES DOS HIDROLISADOS

4.1 INTRODUÇÃO

O emprego de subprodutos agroindustriais como fonte de ingredientes e compostos bioativos tem se revelado bastante promissor, não só como uma necessidade, mas como uma oportunidade para obtenção de novos produtos de valor agregado. Dessa forma, o estudo da caracterização e aplicações desses subprodutos é necessário para sua valorização. Um dos métodos utilizados para obtenção de compostos de maior valor é a hidrólise enzimática (NASRI et al., 2012; UDENIGWE; HOWARD, 2013).

Um exemplo de subproduto que pode ser reutilizado é o sangue suíno proveniente de abatedouros. O sangue suíno higienicamente coletado pode ser processado para obter diferentes hemo-derivados, que podem ser usados em produtos alimentícios para diferentes finalidades, tanto para melhorar as propriedades tecnológicas dos alimentos como também para proporcionar propriedades bioativas promotoras de saúde (incluindo atividade antidiabética, anti-hipertensiva, anticancerígena, anti-inflamatória, antioxidante, imunomoduladora e antimicrobiana), relacionadas à composição, sequência e comprimento dos aminoácidos gerados. (LYNCH et al., 2017).

A hidrólise enzimática de proteínas pode ser realizada pela ação de proteases, que são enzimas que clivam ligações peptídicas nas proteínas e em fragmentos (peptídeos e aminoácidos), podendo estes peptídeos possuir bioatividades (propriedades funcionais e nutricionais). Tal processo depende de vários fatores, tais como, o tipo de protease, as características físicas e químicas do substrato e as condições de hidrólise (FU et al., 2018;

SARMADI; ISMAIL, 2010). A Protezyn APP 3000 é uma protease alcalina de grau alimentício derivada de *Bacillus licheniformis*. É uma endopeptidase classificada como uma subtilisina, uma serina-protease, sendo efetiva em temperatura de até 65 °C e atua em pH de 7 a 10, hidrolisando principalmente ligações peptídicas contidas em resíduos hidrofóbicos no lado carboxílico.

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi obter hidrolisados de plasma suíno utilizando uma protease alcalina e determinar as atividades antimicrobiana, antioxidante, antidiabética e anti-hipertensiva, caracterizadas como propriedades bioativas.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Reagentes

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Bioprocessos, Laboratório de Operações Unitárias, Laboratório de Microbiologia da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC) de Pinhalzinho – SC e Complexo de Laboratórios Multiusuários (UEPG) de Ponta Grossa - PR. Para este estudo foi utilizado plasma suíno (AP920) fornecido pela empresa APC do Brasil Ltda (Chapecó, SC, Brasil) e Protezyn APP 3000 de *Bacillus licheniformis* fornecida pela Prozyn (São Paulo, SP, Brasil). Os principais reagentes utilizados foram: tartarato de sódio e potássio, carbonato de sódio, sulfato de cobre II, hidróxido de sódio, ácido clorídrico, fosfato de sódio monobásico, fosfato de sódio dibásico, tris (hidroximetil) aminometano, ácido tricloroacético (TCA), ferricianeto de potássio, cloreto férrico, 1,1-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Aldrich, D9132), álcool etílico 95%, Folin-Ciocalteu (Sigma–Aldrich, F9252), glicerol, 2-mercaptoetanol (β ME), acrilamida, *N*, *N*, *N*', *N*' - tetrametiletilenodiamina (TEMED), bis-acrilamida, glicina, dodecil sulfato de sódio (SDS), persulfato de amônio, marcador de massa molecular de proteína de ampla faixa (10-225 Da), azul brilhante de coomassie (R-250), ácido acético, amido solúvel, α -Amilase de *Aspergillus oryzae*, α -Glucosidase de *Saccharomyces cerevisiae*, p-nitrofenil α -D-glucosídeo (pNPG) e ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), enzima de conversão da angiotensina do pulmão de coelho (ECA), N- [3- (2- Furil) acrilóil] -o- fenilalanil- glicil- glicina (FAPGG).

4.2.2 Equipamentos

Foram utilizados os seguintes equipamentos: Banho-maria digital (Modelo SSD-5L, potência 550 W, Solidsteel, Piracicaba, SP, Brasil), Banho Dubnoff Microprocessado Digital (Modelo SL-157, SOLAB, Piracicaba, SP, Brasil), Centrífuga Refrigerada (Modelo SL-703, SOLAB, Piracicaba, SP, Brasil), Centrífuga de Bancada (Modelo K14-4000, KASVI, São José

do Pinhais, PR, Brasil), pHmetro de Bancada (Modelo Q-400AS, QUIMIS, Diadema, SP, Brasil), Agitador Magnético com Aquecimento (Modelo CE-495, CienlaB, Campinas, SP, Brasil), Bloco Microdigestor de Kjeldahl Microprocessado (Modelo Q327M, QUIMIS, Diadema, SP, Brasil), Colorímetro (CR-400, Konica Minolta), espectrofotômetro UV-Vis (Modelo DR 3900, Hach), Balança Analítica (Modelo AUX220, Marte Científica, SP), Sistema de eletroforese vertical (Vert-i10), Liofilizador (Modelo TFD5503, ilShin Europe), leitora de microplaca (Kasuki Modelo DR-200BS), Ultra Freezer (IULT335D/368, Indrel Scientific, Londrina, PR), espectrofotômetro (Shimadzu FT-IR 8400, Kyoto, Japão), turbidímetro (Tecnal, Modelo TB-2000, SP) e transiluminador (TFX 35M, Life Technologies, Gibco BRL).

4.2.4 Caracterização físico-química do plasma suíno

A caracterização físico-química (teor de proteínas, lipídeos, cinzas e umidade) do plasma suíno foi obtida de acordo com os métodos da AOAC (AOAC, 2016). O teor de proteína foi determinado pelo método de Kjeldahl usando o fator de conversão de proteína de nitrogênio 6,25. O teor lipídico total foi determinado pelo método de extração Soxhlet com éter de petróleo. O teor de umidade foi analisado pelo método de evaporação a 105 °C até massa constante. O teor total de cinzas foi analisado por aquecimento da amostra em mufla a uma temperatura de 550 °C, até a massa constante. O teor de carboidratos foi estimado descontando-se de 100% a porcentagem dos demais componentes determinados analiticamente. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.2.5 Otimização das condições experimentais para a obtenção dos hidrolisados de plasma suíno

Para a otimização das condições reacionais de obtenção dos hidrolisados de plasma suíno utilizou-se um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), verificando a influência de 3 variáveis experimentais. A Tabela 2 mostra as variáveis e os níveis, com valores codificados e reais do DCCR com pontos axiais, cuja resposta foi o grau de hidrólise (GH) (%).

Como variáveis de entrada foram investigados o pH, temperatura (°C) e agitação (rpm). Como variável de resposta foi medido o GH. Um total de 17 ensaios de hidrólise foram realizados para otimização destas variáveis e os resultados analisados estatisticamente, sendo utilizada a Metodologia de Superfície de Resposta. O delineamento com três variáveis, incluindo três repetições no ponto central, foi usado para ajustar à superfície de resposta de segunda ordem.

Tabela 2 – Variáveis e níveis, com valores codificados e reais, do Delineamento Composto Central Rotacional com pontos axiais utilizado no estudo da otimização da hidrólise de plasma suíno utilizando uma protease alcalina.

Variáveis	Níveis				
	- α	-1,0	0,0	1,0	+ α
Temperatura (°C) (x ₁)	45	49	55	61	65
pH (x ₂)	6,8	7,5	8,5	9,5	10,2
Agitação (rpm) (x ₃)	83	100	125	150	167
$\alpha = 1,68$					

Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

As funções de resposta foram relacionadas às variáveis de entrada por um polinômio de segundo grau, conforme a Equação 1:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=2}^k \beta_{ij} x_i x_j \quad (1)$$

Onde, x_i , x_j , x_k são as variáveis independentes (temperatura, pH e agitação) que afetam a resposta prevista y (neste caso o GH) e β_0 , β_i , β_{ii} , β_{ij} são os coeficientes de intercepto, linear, quadrático e termos de interação. Os coeficientes da função resposta e sua significância estatística foram avaliados pela análise de regressão da superfície de resposta. O teste de Fisher (valor F) foi utilizado para determinar se o modelo de segunda ordem era adequado para descrever os dados obtidos, enquanto a adequação do modelo foi avaliada pelo coeficiente de determinação (R^2).

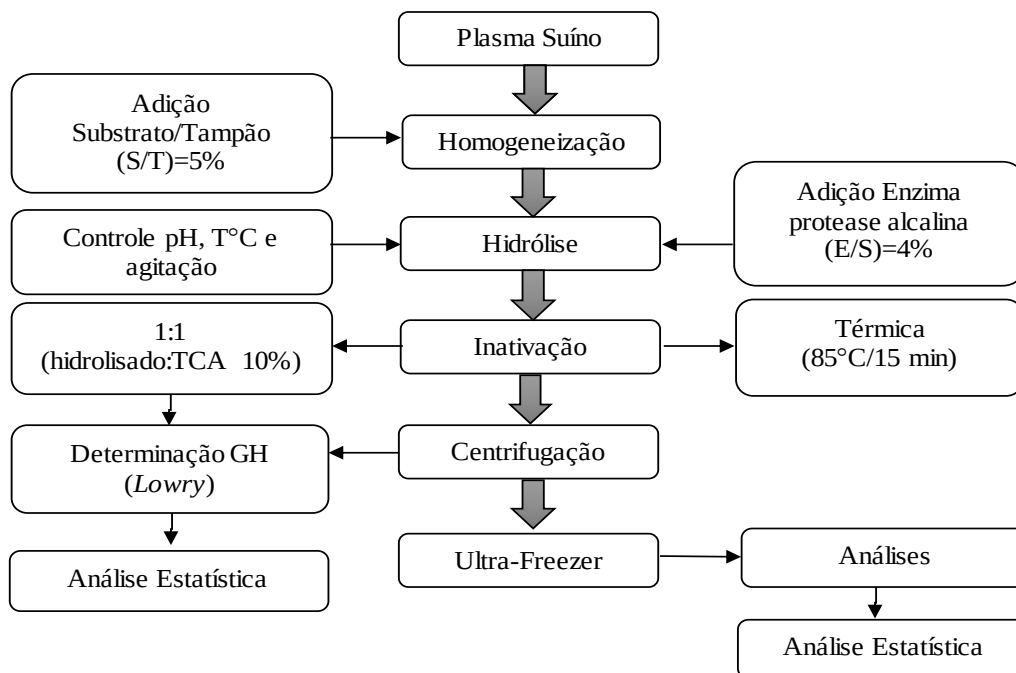
Após a otimização das condições de hidrólise, repetiu-se a reação na condição otimizada e obteve-se hidrolisados dos tempos 0 min, 15 min, 30 min, 60 min 90 min e 120 min de processo. Estes hidrolisados foram utilizados para a determinação das bioatividades.

4.2.6 Obtenção dos hidrolisados proteicos de plasma suíno

O processo de obtenção dos hidrolisados proteicos de plasma utilizando uma protease alcalina, tanto na etapa de otimização como na sequência do estudo, seguiu as etapas mostradas na Figura 3.

Os ensaios de hidrólise foram conduzidos em frascos Erlenmeyers, nos quais o plasma suíno foi suspenso em tampão Tris-HCl (0,2 M) na proporção substrato/tampão (S/T) de 5% em relação ao teor de proteína do plasma. O pH da suspensão foi ajustado com NaOH 1N e/ou HCl 1N, sendo então adicionada a enzima na proporção (E/S) de 4%. A mistura foi exposta ao tratamento em banho de agitação orbital seguindo as condições definidas pelo DCCR.

Figura 3 - Fluxograma da obtenção dos hidrolisados proteicos de plasma suíno utilizando uma protease alcalina.



Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

Alíquotas dos hidrolisados foram coletados nos tempos 0 min, 15 min, 30 min, 60 min, 90 min e 120 min, seguido da inativação enzimática realizada com ácido tricloroacético (TCA) 20% até concentração final de 10% (1:1) para medida do grau de hidrólise e por via térmica (aquecimento a 85°C por 15 min) para a produção do hidrolisado proteico final. A mistura reacional do hidrolisado obtido por inativação térmica foi centrifugado 10.000xg durante 15 min a 4°C para a remoção do material insolúvel precipitado pelo TCA, e imediatamente coletado e congelado em ultra-freezer para posterior determinação das demais análises (HOYLE; MERRITT, 1994). As proteínas solúveis foram quantificadas pelo método de Lowry et al. (1951), no qual a concentração de proteína foi calculada utilizando a curva padrão de albumina bovina, obtida utilizando concentrações de albumina bovina de 0,01 a 0,73 mg.mL⁻¹. As leituras das amostras foram realizadas em espectrofotômetro a 660 nm. O GH foi expresso como percentagem de proteínas solúveis no TCA em relação à quantidade de proteína inicial total, e calculado em mg.mL⁻¹, utilizando-se a Equação 2.

$$GH = \frac{\text{Proteína Solúvel em TCA (10\%)}}{\text{Proteína Total da Amostra}} \times 100 \quad (2)$$

4.2.7 Determinação da proteína solúvel em TCA dos hidrolisados de plasma suíno

A determinação da proteína solúvel dos hidrolisados de plasma suíno, cujo resultado é utilizado para o cálculo do GH, foi realizada empregando a metodologia de Lowry, de acordo

com Macedo et al. (2005). Em tubos de ensaio contendo 500 µL dos hidrolisados, foi adicionado 500 µL do reagente A (2 g $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 100 g de Na_2CO_3 em 500 mL de uma solução NaOH 1N e completado o volume de 1000 mL com água destilada), em seguida a mistura foi agitada e incubada em banho-maria a 50 °C por 10 min. Passando o tempo de tratamento térmico, os tubos foram resfriados em água corrente e adicionado 50 µL do reagente B (5 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 10 g $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ em 50 mL de NaOH 1N e completado o volume para 500 mL com água destilada), sendo a mistura agitada e em seguida deixada em repouso por mais 10 min. Posteriormente, foi adicionado 1500 µL de reagente de *Folin Ciocalteu* 1:15 (reagente C) sendo a mistura agitada e incubada a 50 °C por 10 min. Transcorrido o tempo, os tubos foram resfriados e as amostras foram lidas em espectrofotômetro a 660 nm. As amostras foram lidas contra um branco (500 µL de água destilada e 2000 µL de reagente A).

4.2.8 Determinação dos parâmetros cinéticos da protease (K_m e $v_{m\acute{a}x}$)

As constantes cinéticas, K_m e $v_{m\acute{a}x}$, da protease alcalina foram determinadas utilizando diferentes concentrações de substrato (1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9% e 10%, m.v⁻¹). A relação S/T e as demais variáveis seguiram as condições otimizadas do planejamento. Para todos os ensaios, o GH foi determinado após 120 min de reação. Os valores aparentes de K_m e $v_{m\acute{a}x}$ foram calculados a partir da equação de Michaelis-Menten (Equação 3), linearizada utilizando o método de Lineweaver-Burk, obtendo-se um gráfico de $1/v_0$ versus $1/S$, onde $[S]$ é a concentração do substrato, v e $v_{m\acute{a}x}$ representam a taxa inicial e máxima de reação, respectivamente, e K_m é a constante de Michaelis-Menten.

$$v = \frac{v_{m\acute{a}x} \times S}{S + K_m} \quad (3)$$

4.2.9 Análise da cor instrumental dos hidrolisados proteicos de plasma suíno

A determinação da cor dos hidrolisados foi realizada através do sistema CIE, através dos parâmetros de medida L^* (luminosidade), a^* (vermelho, + ou verde, -) e b^* (amarelo, + ou azul, -) e b^* (-60 = azul, +60 = amarelo). A cor foi avaliada como ângulo de matiz ($h = \tan^{-1} [b^*/a^*]$), que corresponde ao tom da cor e está associado à cor percebida pelo olho humano, onde 0° = vermelho, 90° = amarelo, 180° = verde e 270° = azul e croma ($C = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2}$), ou saturação de cor, uma medida da vivacidade da cor (valores mais altos indicam uma cor mais vívida) (ANSORENA et al., 1997).

4.2.10 Tamanho das frações peptídicas através da eletroforese SDS-PAGE

Os hidrolisados de plasma suíno obtidos em diferentes intervalos de tempo de hidrólise pela protease alcalina, foram aplicados em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 15% (m.v⁻¹). Os peptídeos foram diluídos em tampão de amostra (glicerol 100%, SDS 10%, Tampão Tris 0,5 M pH 6,8 e azul de bromofenol 0,5%) e aquecidas a 95 °C por 5 min. A corrida de eletroforese foi realizada ajustando-se a potência para 60 V até as amostras ultrapassarem o gel de empilhamento e então ajustou-se para 120 V até o final da corrida. Em seguida, as bandas de proteínas foram coradas com azul brilhante de *Coomassie*, descoradas em solução descorante (metanol 25%, ácido acético 10% e água destilada 65%) e visualizadas sob luz UV em transiluminador (LAEMMLI, 1970).

4.2.11 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) dos hidrolisados de plasma suíno

As amostras foram devidamente dispersas em pastilhas de KBr. Os espectros de FT-IR (4.000 – 400 cm⁻¹) dos hidrolisados foram produzidos a uma resolução de 4 cm⁻¹ a qual foram realizados 64 varreduras e determinadas as transmitâncias (WOJEICCHOWSKI et al., 2018).

4.2.12 Atividade antimicrobiana

Cinco cepas microbianas, três bactérias Gram positivas (G⁺) (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* CCCD B001 e *Listeria monocytogenes* Scott A) e duas bactérias Gram negativas (G⁻) (*Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 e *Escherichia coli* ATCC 25922) foram usadas como indicadores para avaliar a atividade antimicrobiana. As culturas indicadoras foram repicadas em 9 mL de caldo BHI e incubadas em *overnight* à 37°C. Após incubação, as culturas foram diluídas para 10⁶ UFC.mL⁻¹. A atividade antimicrobiana dos hidrolisados de plasma suíno, foram avaliadas pelo ensaio de difusão em disco conforme descrito Bauer et al. (1966). Os peptídeos testados foram filtrados através de um filtro de membrana de acetato de celulose com tamanho de poro de 0,45 µm (Sartorius Stedim Biotech S.A., Alemanha). Discos de papel estéreis (com diâmetro de 5 mm) foram saturados com 15 µL de amostras, e colocados na superfície das placas de ágar TSA (Tryptona de Soja), previamente semeadas com 100 µL da cepa indicadora. As placas foram então incubadas a 37°C durante 24 h e subsequentemente examinadas quanto à presença de zonas de inibição indicativas de atividade antimicrobiana. A atividade antimicrobiana foi comparada com controles positivos: Penicilina (10 µg), Ampicilina (10 µg) e Tetraciclina (30 µg).

4.2.13 Atividade antioxidante

4.2.13.1 Atividade de eliminação de radicais DPPH

O ensaio da atividade de eliminação de radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) foi determinada de acordo com Najafian e Babji (2014) com modificações. 1 mL de cada amostra (0,1; 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4; e 5 mg.mL⁻¹) foram misturados com 1 mL de 0,15 mM de DPPH em etanol a 95%. Após mistura vigorosa, a solução foi incubada durante 30 min à temperatura ambiente no escuro. A leitura de absorbância foi realizada a 517 nm. Uma solução de controle, utilizando água destilada em vez da amostra, foi preparada da mesma maneira. O efeito de eliminação foi quantificado de acordo com a Equação 4:

$$DPPH \text{ (%) } = \left[\frac{(A_{controle} - A_{amostra})}{A_{controle}} \right] \times 100 \quad (4)$$

Onde $A_{controle}$ representa a absorbância do controle e $A_{amostra}$ representa a absorbância da amostra. A concentração de eliminação (EC_{50}) foi definida como a quantidade de hidrolisado necessária para redução de 50% da atividade de eliminação do radical livre. Os valores de EC_{50} foram obtidos a partir das curvas de inibição resultantes.

4.2.13.2 Poder antioxidante redutor de ferro

O poder antioxidante redutor de ferro foi determinado seguindo o método de Wu; Chen; Shiau (2003). Foram adicionados 2 mL de amostra (1, 2, 3, 4 e 5 mg.mL⁻¹) e 2 mL de ferricianeto de potássio (1%) a 2 mL de tampão fosfato 0,2 M (pH 6,6) e a mistura foi incubada a 50 °C durante 20 min. Em seguida, 2 mL de TCA 10% foram adicionados e centrifugados durante 10 min a 1210xg. À camada superior (2 mL) de cada amostra, foram adicionados 2 mL de água destilada e 0,4 mL de cloreto férrico (0,1%). A reação foi deixada em repouso durante 10 min e a absorbância da solução foi medida a 700 nm. O controle foi preparado usando água destilada em vez da amostra. O aumento da absorbância a 700 nm indica um aumento do poder de redução dos hidrolisados.

4.2.14 Ensaio de inibição da α -amilase e da α -glucosidase (atividade antidiabética)

Um ensaio inibidor de α -amilase foi realizado de acordo com o método de Bernfeld, 1951; Oboh; Ademiluyi; Faloye (2011). Em tubos de ensaio adicionou-se 125 μ L de hidrolisado (0,5 a 2,0 mg.mL⁻¹) e 125 μ L da solução de α -amilase (0,5 mg.mL⁻¹) preparada em tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 6,9). O conteúdo de cada tubo foi pré-incubado a 25 °C por 10 min. Após, foram adicionados 125 μ L de solução de amido a 1% em tampão fosfato de sódio

20 mM (pH 6,9) e as misturas reacionais foram incubadas a 25 °C durante 10 min. A reação foi interrompida pela adição de 250 µl do reagente corante DNS e, posteriormente, incubada em água fervente por 5 min e resfriada à temperatura ambiente. O conteúdo de cada tubo de ensaio foi diluído com 2,5 mL de água destilada e a absorbância medida a 540 nm. Um controle foi preparado usando o mesmo procedimento, exceto que o hidrolisado foi substituído por tampão fosfato de sódio. A atividade inibidora da α -amilase foi calculada como mostrado na Equação 5:

$$\% \text{ inibição} = \left[\frac{(A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}})}{A_{\text{controle}}} \right] \times 100 \quad (5)$$

Onde A_{controle} representa a absorbância do controle e A_{amostra} representa a absorbância da amostra.

A atividade inibitória da α -glucosidase foi determinada de acordo com o método descrito por Apostolidis; Kwon; Shetty (2007). Foram misturados 50 µL dos hidrolisados em diferentes concentrações (0,1 a 2,0 mg.mL⁻¹) com 100 µL de enzima (1 U.mL⁻¹ em tampão fosfato de sódio a 0,1 M pH 6,9) e incubados durante 10 min, a 25 °C. Posteriormente, foram adicionados 50 µL de pNPG (5 mM) e as amostras foram incubadas durante 5 min a 25 °C. A absorbância foi lida a 405 nm em leitor de microplacas. O controle continha 50 µl de solução tampão no lugar do hidrolisado. A atividade inibidora da α -glucosidase foi expressa como (%) de inibição e foi calculada como mostrado na Equação 6:

$$\% \text{ inibição} = \left[\frac{(A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}})}{A_{\text{controle}}} \right] \times 100 \quad (6)$$

Onde A_{controle} representa a absorbância do controle e A_{amostra} representa a absorbância da amostra.

4.2.15 Atividade inibitória da enzima conversora da angiotensina (ECA) (atividade anti-hipertensiva)

A atividade inibitória da ECA dos hidrolisados foi realizada de acordo com o método descrito por (ELAVARASAN; SHAMASUNDAR, 2014; RAGHAVAN; KRISTINSSON, 2009). Foram misturados o hidrolisado (200 µl de uma solução 2,0 mg.mL⁻¹ de concentração proteica), a enzima ECA (100 µl de uma solução 50 mU de enzima) dissolvida em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) contendo NaCl 0,3 M e o substrato FAPGG (2 mL de uma solução 0,5 mM) dissolvido em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) contendo NaCl 0,3 M. A hidrólise de FAPGG por ECA resulta numa diminuição da absorbância a 340 nm e esta foi monitorada

durante 30 min a 25 °C. Uma amostra contendo FAPGG e ECA foi utilizada como controle. Maleato de enalapril, um inibidor sintético, foi usado como padrão para comparar a atividade inibitória da ECA na concentração de 10^{-3} M. A inibição da ECA foi calculada de acordo com a Equação 7:

$$\% \text{ inibição da ECA} = \left[\frac{(A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}})}{A_{\text{controle}}} \right] \times 100 \quad (7)$$

Onde A_{amostra} é a absorbância da mistura de enzima, hidrolisado e substrato e A_{controle} é a absorbância da mistura enzima e substrato (sem hidrolisado).

4.2.16 Análise estatística

Todos os ensaios foram realizados em triplicata e a significância estatística entre os níveis foi avaliada usando análise de variância (ANOVA) e a diferença entre as médias foi avaliada utilizando o teste de Tukey ($p < 0,05$). O software *Statistica®* 13.3 foi utilizado para a geração e avaliação do planejamento experimental estatístico.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Caracterização físico-química do plasma suíno

A caracterização do plasma suíno está apresentada na Tabela 3, cujos resultados são expressos sobre a base seca, na forma de média da triplicata $\pm$ desvio padrão. Deve-se notar que o conteúdo de proteína bruta no plasma foi de 82,44%. Os resultados indicam que o aproveitamento dessa matéria-prima pode ser destinado a produção de hidrolisados de proteína, através do qual este constituinte, nutricionalmente importante, pode ser recuperado.

Tabela 3 - Caracterização do plasma suíno utilizada para a preparação dos hidrolisados.

Parâmetro (%)	Plasma
Umidade	$5,06 \pm 0,13$
Proteína	$82,44 \pm 0,25$
Lipídios	$0,59 \pm 0,30$
Cinzas	$7,42 \pm 0,07$
Carboidratos	$4,49 \pm 0,15$

Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

Niu et al. (2018) utilizaram plasma suíno contendo 85% de proteína, adquirido da Beidahuang Meat Corporation (Harbin, Heilongjiang, China), com valor próximo ao encontrado neste estudo, para proteína. Pérez-Gálvez et al. (2011) realizaram estudo de hidrólise enzimática empregando farinha de sangue suína (Protesan, APC, Barcelona, Espanha), obtida de sangue de porco por coagulação e secagem, contendo 89% em proteína,

1,5% em gordura e 1,2% em cinzas. Desta forma, fica evidenciado o alto teor de proteína deste subproduto.

4.3.2 Otimização das condições experimentais para a obtenção dos hidrolisados de plasma suíno

Na Tabela 4 estão mostrados os resultados do grau de hidrólise (GH) para os experimentos do Delineamento Composto Central Rotacional, utilizando plasma suíno e a protease alcalina.

Tabela 4 - Resultados do grau de hidrólise do plasma suíno pela protease alcalina para os experimentos do Delineamento Composto Central Rotacional com pontos axiais utilizado na otimização das variáveis através da metodologia de superfície de resposta.

Variáveis independentes				Variável de Resposta
Experimento	Temperatura (°C) (x_1)	pH (x_2)	Agitação (rpm) (x_3)	GH (%)
E1	-1,0 (49)	-1,0 (7,5)	-1,0 (100)	30,27
E2	-1,0 (49)	-1,0 (7,5)	1,0 (150)	30,37
E3	-1,0(49)	1,0 (9,5)	-1,0 (100)	37,78
E4	-1,0 (49)	1,0 (9,5)	1,0 (150)	37,19
E5	1,0 (61)	-1,0 (7,5)	1,0 (100)	41,56
E6	1,0 (61)	-1,0 (7,5)	1,0 (150)	41,49
E7	1,0 (61)	1,0 (9,5)	-1,0 (100)	41,11
E8	1,0 (61)	1,0 (9,5)	1,0 (150)	44,54
E9	-1,68 (45)	0,0 (8,5)	0,0 (125)	33,05
E10	1,68 (65)	0,0 (8,5)	0,0 (125)	42,45
E11	0,0 (55)	-1,68 (6,8)	0,0 (125)	33,81
E12	0,0 (55)	1,68 (10,2)	0,0 (125)	37,70
E13	0,0 (55)	0,0 (8,5)	-1,68 (83)	39,22
E14	0,0 (55)	0,0 (8,5)	1,68 (167)	35,36
E15 (C)*	0,0 (55)	0,0 (8,5)	0,0 (125)	37,24
E16 (C)*	0,0 (55)	0,0 (8,5)	0,0 (125)	37,34
E17 (C)*	0,0 (55)	0,0 (8,5)	0,0 (125)	37,50

*(C) ponto central do planejamento experimental.

Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

O maior valor obtido para o GH foi nos ensaios E8 e E10 (44,54 e 42,45%, respectivamente) e o menor foi em E1, com GH de 30,27%. A baixa variabilidade dos pontos centrais (E15, E16 e E17) indicou boa reprodutibilidade dos dados experimentais.

A Tabela 5 mostra as estimativas dos coeficientes obtidos a partir do modelo de regressão no DCCR. Observou-se que os parâmetros temperatura (L) e (Q), pH (L) e (Q), agitação (L) e (Q) e todas as interações foram significativos ($p < 0,05$), sendo que o fator temperatura (L) foi o que apresentou maior efeito sobre a resposta analisada. Apenas os parâmetros pH (Q), agitação (L) e a interação temperatura X pH apresentaram efeito negativo.

Tabela 5 - Estimativas dos coeficientes obtidos a partir do modelo de regressão no DCCR para a temperatura, pH e agitação no processo de hidrólise enzimática do plasma com protease alcalina.

Fator	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t-value	p-value
Intercessão	37,2870	0,0756	493,4057	0,0000
Temperatura (L)*	7,1611	0,0710	100,8926	0,0001
Temperatura (Q)*	0,7789	0,0781	9,9700	0,0099
pH (L)*	3,4374	0,0710	48,4299	0,0004
pH (Q)*	-0,6318	0,0781	-8,0877	0,0149
Agitação (L)*	-0,5304	0,0710	-7,4727	0,0174
Agitação (Q)*	0,4536	0,0781	5,8063	0,0284
Temperatura X pH	-2,9325	0,0927	-31,6220	0,0010
Temperatura X Agitação	0,9625	0,0927	10,3789	0,0092
pH X Agitação	0,7025	0,0927	7,5753	0,0174

*Fator de significancia (p<0,05) (L):linear (Q): quadrático

Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

A análise de variância (ANOVA) mostrou que 91,34% da variação total foi explicada pelo modelo. O valor F calculado (5,84) para a regressão foi maior do que o valor F tabelado (3,68) com intervalo de confiança de 95% (p <0,05), refletindo a significância estatística do modelo (Tabela 6).

Tabela 6 – ANOVA para o modelo polinomial de segunda ordem referente ao grau de hidrólise do plasma obtido com o uso da protease alcalina.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	F calculado
Regressão	241,0036	9	26,7782	5,84
Falta de Ajuste	22,8224	5	4,5645	
Erro puro	0,0344	2	0,0172	
Total	263,8604	16		

$F_{0,05;9,7}$ (F tabelado) = 3,68 $R^2 = 0,9134$

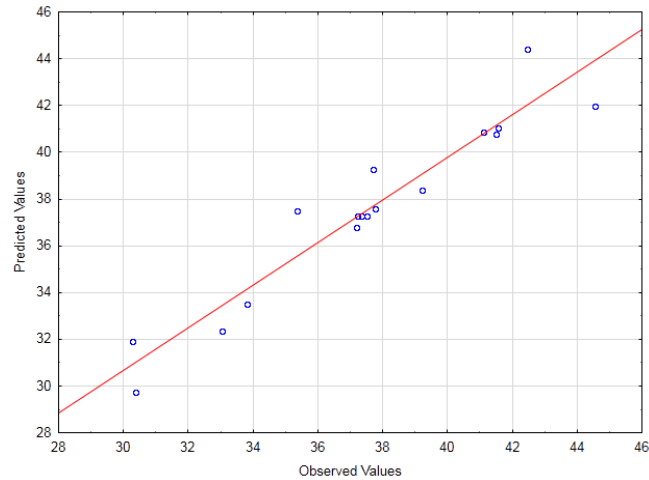
Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

A Figura 4 compara os valores previstos pelo modelo matemático com os dados observados para a variável de resposta, evidenciando uma correlação confiável com o coeficiente de determinação $R^2=0,9134$.

O valor real para o GH foi ajustado ao modelo quadrático completo descrito pela Equação 1. O coeficiente polinomial para o modelo de resposta superficial foi calculado por regressão múltipla, obtendo-se a equação (8), que relaciona a resposta aos fatores de entrada temperatura (x_1), pH (x_2), e agitação (x_3):

$$GH(\%) = 37,2870 + 7,1611 x_1^2 + 0,7789 x_1^2 + 3,4374 x_2 - 0,6318 x_2^2 - 0,5304 x_3 + 0,4536 x_3^2 - 2,9325 x_1 x_2 + 0,9625 x_1 x_3 + 0,7025 x_2 x_3 \quad (8)$$

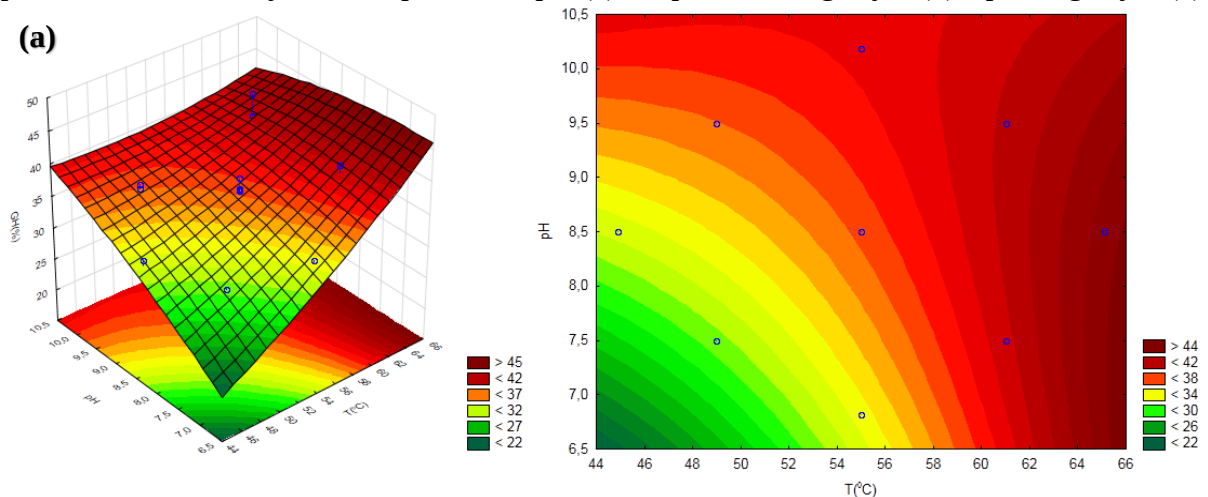
Figura 4 - Comparação entre o valor experimental (observado) e calculado da variável de resposta (GH) (predito).

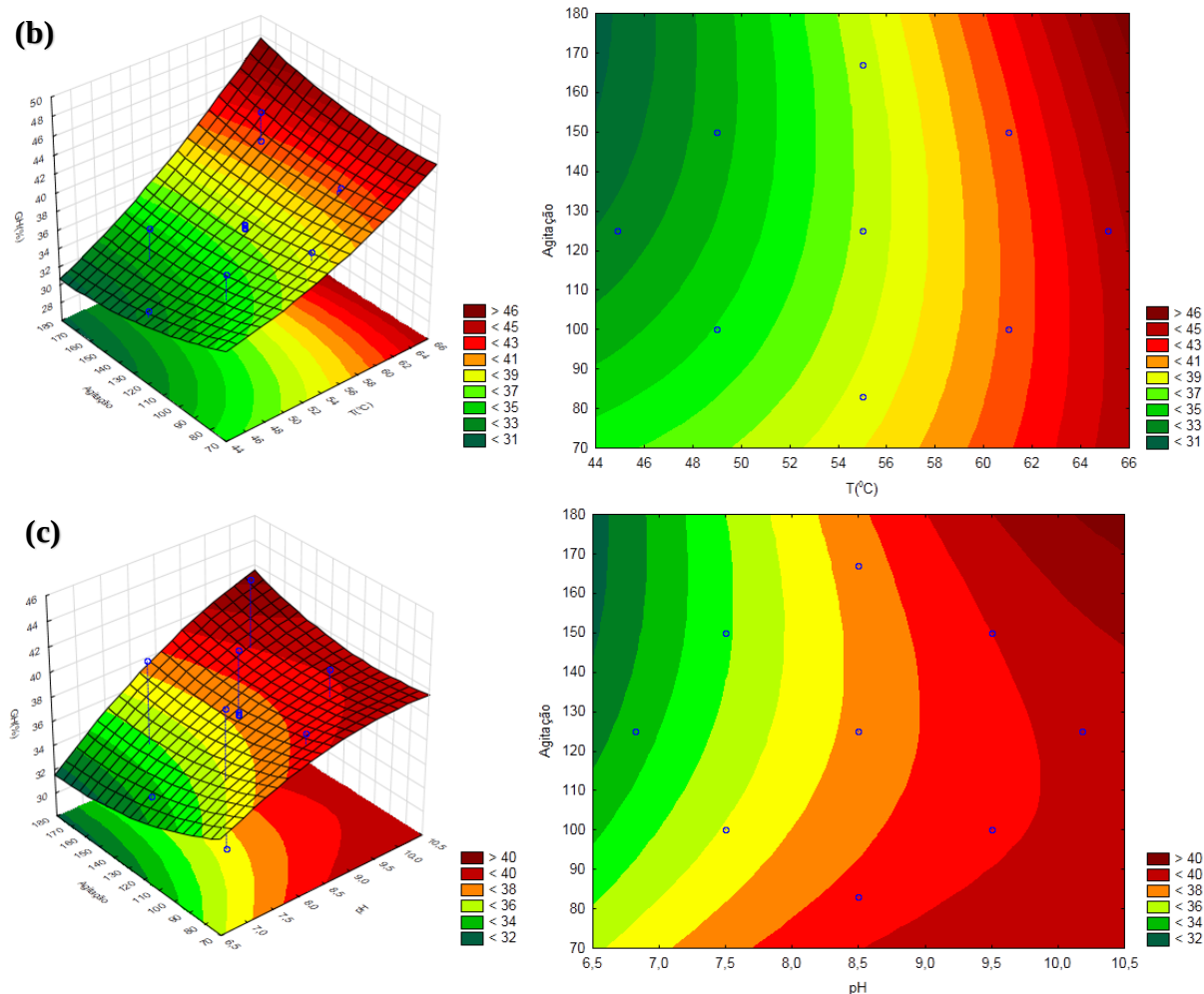


Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

A Figura 5 mostra o efeito combinado dos parâmetros do processo no GH, através das Superfícies de Resposta e das Curvas de Contorno. Foi observado que o maior GH foi alcançado no maior valor de temperatura e no ponto central relacionado ao pH (Figura 5a). Um aumento de temperatura ou a variação da agitação, não causou aumento no GH. Uma tendência similar foi obtida para o pH, tendência esta que pode ser vista nas Figuras 5b e 5c.

Figura 5 - Superfícies de Resposta e Curvas de Contorno referentes ao grau de hidrólise do plasma suíno em função da temperatura e pH (a) temperatura e agitação (b) e pH e agitação (c).





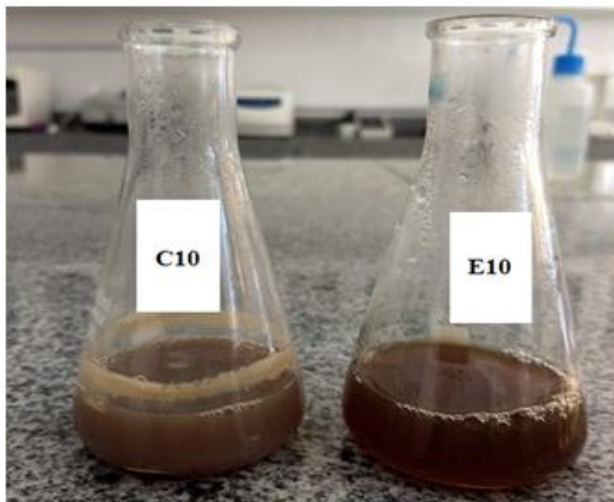
Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

Verificou-se nas superfícies de resposta que a região de maximização do GH encontra-se nos níveis (+1,68; 0; 0), correspondendo ao E10 (65 °C para a temperatura, 8,5 para o pH e 125 rpm para agitação). O aspecto visual do experimento nas condições de otimização e em 120 min de hidrólise comparado ao experimento nas mesmas condições da otimização, porém sem a presença da enzima, está mostrado na Figura 6. Visualiza-se uma leve alteração de cor/turbidez entre a amostra não hidrolisada (C10) e a amostra hidrolisada (E10).

O estudo desenvolvido por Pérez-Gálvez et al. (2011) realizou a otimização da hidrólise da proteína de farinha de sangue suína com Alcalase® para obter um produto para utilização na composição de um fertilizante orgânico. Os fatores experimentais foram o pH (6,0, 6,5, 7,0 e 7,5), a temperatura (50 °C, 55 °C e 60 °C) e a relação enzima-substrato (5%, 7,5% e 10%). Os níveis apresentados foram otimizados por meio de um experimento estatístico e MSR para maximizar o GH. Obtiveram o GH de 28,89%, em pH 6,24, 54,2 °C e razão E/S de 10%. Resultado próximo foi encontrado no E1 (GH=30,27) porém em outras condições de ensaio (49 °C, pH 7,5 e 100 rpm), e utilizando uma razão E/S inferior (4%). Tal comparação mostra que a

enzima consegue hidrolisar mais facilmente a fração plasmática do sangue ao invés da proteína total da farinha do sangue suíno.

Figura 6 – Aspecto visual do experimento C10 (amostra sem enzima após 120 min submetida as mesmas condições de hidrólise) e do experimento E10 (amostra com enzima após 120 min de hidrólise).



Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

Seo et al. (2015) estabeleceram condições ótimas para a hidrólise da proteína plasmática bovina utilizando Alcalase®. A MSR foi utilizada para modelar e otimizar a resposta do GH Sob as condições ótimas de pH, temperatura e tempo de hidrólise (pH 7,82-8,32, 54,1 °C e 338,4-398,4 min), os valores previstos para GH variaram de 18,70-20,42%. Proteína plasmática suína demandou um tempo de processo menor comparado a proteína plasmática bovina, para atingir um grau de hidrólise inferior sob condições de temperatura mais amenas, indicando que as condições de ensaio influenciam na clivagem das proteínas presentes no substrato utilizado.

A influência de variáveis (temperatura, pH e razão E/S) na cinética de hidrólise enzimática também foi avaliada por Kurozawa; Park; Hubinger (2009) em carne de frango utilizando a protease Alcalase®. Os experimentos foram conduzidos à temperatura de 43 °C a 77 °C, razão E/S de 0,8 a 4,2% m/m e pH de 7,16 a 8,84, de acordo com um planejamento experimental completo. As principais conclusões do estudo mostraram que os maiores valores de GH foram obtidos na temperatura de 60 °C. Observou-se também que o ensaio nas condições de 60 °C, E/S 2,5% e pH 7,16, mesmo com uma menor concentração de enzima usada em relação ao ensaio na condição de 60 °C, E/S 4,2% e pH 8,0, apresentou maior valor de GH, resultado ocorrido provavelmente devido ao efeito do pH sobre a enzima, que tem a sua atividade catalítica restrita a uma pequena faixa. Diante do exposto, a temperatura foi a variável

com maior efeito sobre a reação enzimática tanto para a hidrólise com carne de frango como para o plasma suíno utilizado no estudo.

É importante relatar que uma mudança no pH em uma reação enzimática pode afetar a estabilidade da enzima, causando alteração em sua estrutura conformacional, levando a uma desnaturação irreversível que resulta em uma perda de atividade. Proteases alcalinas apresentam uma alta estabilidade em uma ampla faixa de pH e este fator é dependente do tempo, porém sua redução pode ocorrer quando o tempo de processo é muito longo (WHITAKE; DEKKE, 1994).

Correlacionando os resultados obtidos pelos trabalhos acima citados e os do presente estudo, verificou-se que uma mesma enzima pode possuir diferentes especificidades e condições ótimas. Muitas vezes o desempenho das enzimas é comparado através de experimentos conduzidos nas condições ótimas descritas pelos fabricantes, sem considerar que estas condições ótimas dependem fundamentalmente do substrato utilizado (ASPMO; HORN; EIJSINK, 2005).

Pela determinação dos valores críticos de temperatura, pH e agitação obteve-se medidas do GH do plasma suíno utilizando a protease alcalina para validação do modelo estatístico. O valor previsto pelo modelo é inferior àquele encontrado na determinação experimental nas condições ideais da enzima. O valor de GH obtido pelo procedimento de validação experimental foi de 42,45, valor próximo ao predito pelo modelo matemático nas condições otimizadas (39,26%), apresentando erro relativo de 7,51%, valor aceitável para fins preditivos.

4.3.3 Determinação dos parâmetros cinéticos da protease (K_m e $v_{m\acute{a}x}$)

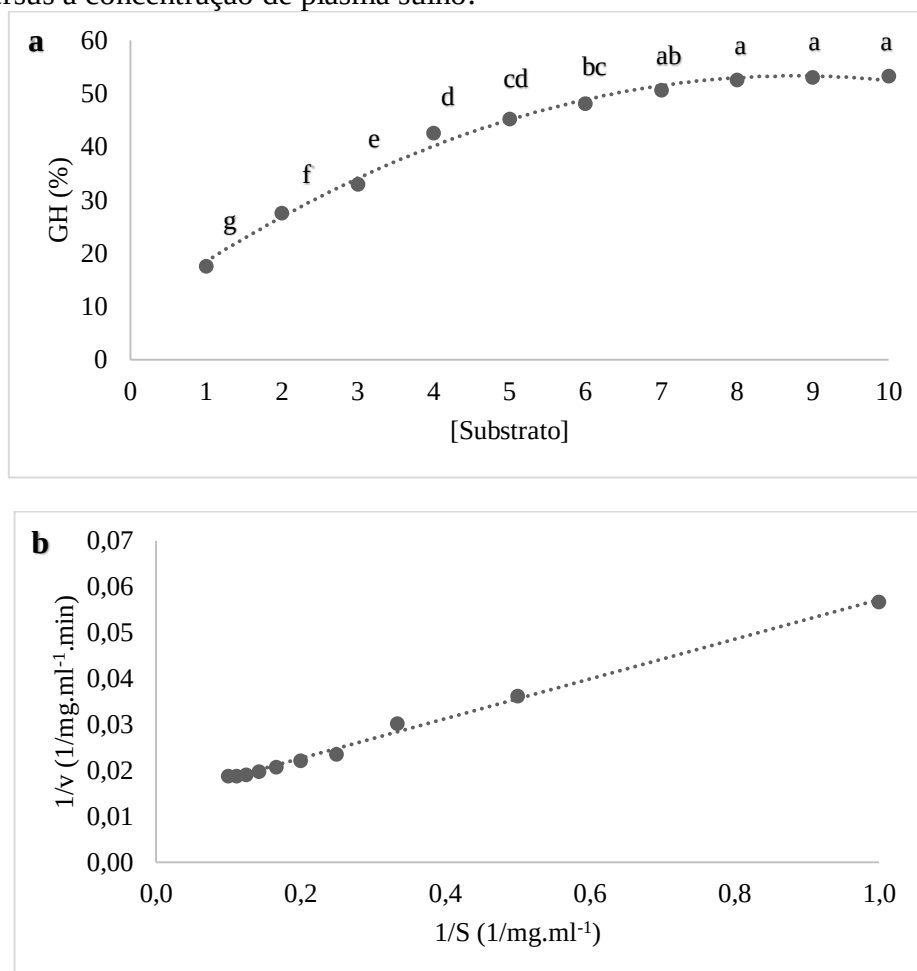
A Figura 7a apresenta a determinação dos parâmetros cinéticos da protease alcalina e mostra que as concentrações de 10, 9, 8 e 7% de substrato não diferiram estatisticamente entre si, assim como 7% e 6%, 6% e 5% e 5% e 4% também não diferiram entre si, ao nível de 95% de confiança.

A concentração de 5% de substrato em relação a proteína, correspondente ao GH de 45,28% foi utilizada juntamente com a condição otimizada, para os experimentos ao longo do tempo. Ainda, na Figura 7a, verificou-se que a partir da concentração de substrato igual a 7%, a curva deixa de seguir a um modelo cinético de primeira ordem e passa a ser de ordem zero, o que significa que o aumento da concentração de substrato, a partir de 7 mg.mL⁻¹ não altera a velocidade da reação.

Traçando os resultados do GH de acordo o gráfico dos recíprocos de Lineweaver-Burk (Figura 7b) observou-se boa correlação com a cinética de Michaelis-Menten ($R^2 = 0,995$). Os

parâmetros cinéticos sugerem que um menor valor de K_m indica maior afinidade pelo substrato, enquanto maior valor de $v_{m\acute{a}x}$ indica melhor cinética de reação (SOUZA et al., 2015).

Figura 7 - Gráfico de duplo recíproco (Lineweaver-Burk) do grau de hidrólise (%) pela protease alcalina versus a concentração de plasma suíno.



Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

O valor de K_m , $v_{m\acute{a}x}$ e o coeficiente de correlação linear obtidos pela linearização de Lineweaver–Burk estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Parâmetros cinéticos K_m , $v_{m\acute{a}x}$ da protease alcalina utilizando o plasma suíno como substrato e coeficiente de correlação linear obtido pela linearização de Lineweaver–Burk.

Hidrólise	Parâmetro	Lineweaver–Burk
Protease alcalina	K_m (mg.mL ⁻¹)	3,1
	$v_{m\acute{a}x}$ (mg.mL ⁻¹ .min)	71,9
	R^2	0,995
Hidrólise nas condições ótimas de pH, temperatura e agitação determinadas pelo DCCR com 120 min de reação		

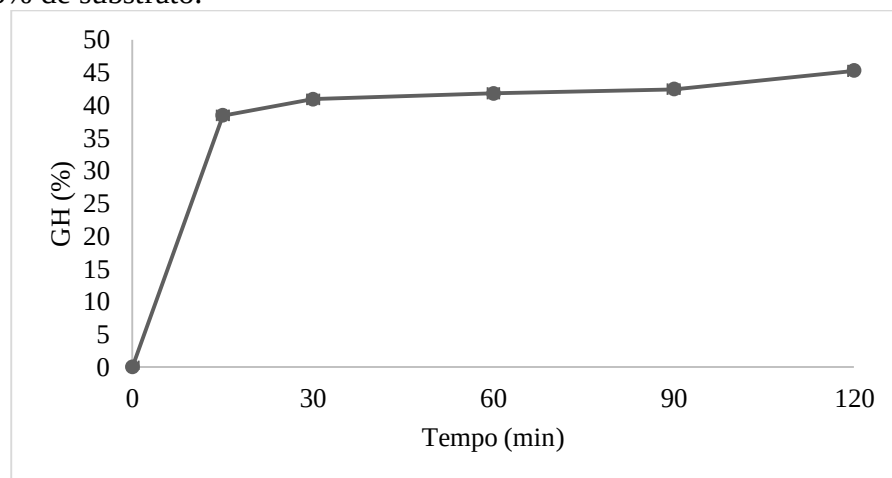
Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

Adler-Nissen (1979), comparou o valor de K_M para hidrólise de diferentes proteínas com Alcalase® e os resultados para hidrolisado de proteínas de soja, caseína e gelatina foram de 6 mg.mL⁻¹, 5 mg.mL⁻¹ e 5 mg.mL⁻¹, respectivamente. O parâmetro cinético de K_M também foi determinado em reação de hidrólise com caseína utilizando Alcalase® e obteve o valor de 3,6 mg.mL⁻¹ (MANNHEIM; CHERYAN, 1990). Tais valores estão próximos ao encontrado no estudo ($K_M=3,1$ mg.mL⁻¹) utilizando uma protease alcalina na hidrólise de plasma suíno.

4.3.4 Determinação do grau de hidrólise do plasma suíno ao longo do tempo

Após determinação da temperatura, pH, agitação ótimos e dos parâmetros cinéticos, realizou-se a hidrólise do plasma suíno com protease alcalina em diferentes tempos, sendo 0 min, 15 min, 30 min, 60 min, 90 min e 120 min. A Figura 8 mostra a curva cinética de hidrólise do plasma suíno, correlacionando o GH e o tempo de reação. Verificou-se que após 120 min o plasma suíno apresentou o maior GH (45,28%).

Figura 8 - Curva cinética de hidrólise do plasma suíno com protease alcalina, em 65 °C, pH 8,5, 125 rpm e 5% de substrato.



Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

Os resultados também mostraram uma rápida e eficaz hidrólise da proteína nos primeiros 15 min indicando que a maioria das ligações peptídicas foram quebradas logo no início da reação, não havendo mais um aumento gradual no GH. Não houve diferença estatística significativa ($p<0,05$) entre o GH de 30 min e 60 min de hidrólise e entre 60 min e 90 min. Já os hidrolisados nos tempos 0 min, 15 min e 120 min diferiram significativamente ($p<0,05$) dos demais.

A protease alcalina se mostrou eficiente desde o momento da incubação, não sendo mais observado presença de partículas sólidas, mostrando que logo após a adição da enzima

associada as condições de processo, o plasma havia sido hidrolisado, e a solução apresentava-se límpida com baixa viscosidade, e sem formação de gel após resfriamento. Pela análise de turbidez foi possível evidenciar tal fato, no qual o hidrolisado de plasma pela protease alcalina no tempo zero apresentou a turbidez de 116 NTU (Unidade Nefelométrica de Turbidez) e a amostra seguinte, o hidrolisado do tempo 15 min, apresentou turbidez de 40 NTU.

Curvas cinéticas de hidrólise similares foram reportadas para resíduos de camarão, carne de frango e hemoglobina bovina, utilizando tratamento enzimático com Alcalase® (HOLANDA; NETTO, 2006; KUROZAWA; PARK; HUBINGER, 2009; MÁRQUEZ; VÁZQUEZ, 1999). As curvas foram caracterizadas por altas taxas de reação iniciais, seguidas por diminuições na taxa de reação até uma fase estacionária, onde, aparentemente, a hidrólise deixou de ocorrer, mostrando semelhança de comportamento entre os estudos. Este perfil pode estar associado a diminuição da concentração de ligações peptídicas disponíveis para clivagem, competição entre o substrato original e os peptídeos formados durante a reação, diminuição da atividade enzimática, devido à desnaturação da enzima e inibição do produto por compostos formados durante a hidrólise (ADLER-NISSEN, 1979; GONZALEZ-TELLO et al., 1994).

Hidrolisados enzimáticos foram obtidos por Verma et al. (2019) a partir da hidrólise de sangue porcino utilizando Alcalase® durante 360 min. O GH obtido para a proteína do sangue suíno foi de 21,53%. No estudo o maior GH foi de 45,28% em apenas 120 min. A taxa de reação enzimática inicial foi mais rápida, diminuindo com o progresso da reação em todas as amostras. Isso pode ser ocasionado devido ao acúmulo dos peptídeos na vizinhança de produtos intermediários e devido à inibição competitiva entre as proteínas intactas e os peptídeos sendo constantemente produzidos durante a reação enzimática. Hidrolisados de frações proteicas de sangue suíno como o plasma ou outras proteínas, talvez sejam mais fáceis de serem clivadas, mostrando uma maior eficiência na digestão, exibindo maior GH em uma menor duração de reação enzimática.

O plasma suíno também foi hidrolisado com Alcalase® por Liu et al. (2010), resultando em GH de 6,2%, 12,7% e 17,6% produzidos em 30 min, 120 min e 300 min, respectivamente. A diferença nos resultados do presente estudo com os citados acima podem ser atribuídas a vários fatores como a quantidade de proteína do plasma utilizada (70%), que foi inferior ao do presente estudo, as condições de hidrólise (55 °C; pH 8,0; E/S 2:100), e o método da determinação do GH, utilizando o método de pH-stat. Todas essas variações podem influenciar diretamente na clivagem das proteínas e na quantidade de peptídeos formados.

4.3.5 Análise da cor instrumental dos hidrolisados proteicos de plasma suíno

Os resultados da cor instrumental, expressa em termos de L*, a*, b*, C* e h, dos hidrolisados de plasma suíno obtidos com o uso da protease alcalina e em diferentes tempos estão apresentados na Tabela 8.

Para o tempo zero, o hidrolisado apresentou menos transparência e/ou brilho ($L^*=29,68$), quando comparado a 120 min ($L^*=31,81$), porém não sendo uma variação expressiva de luminosidade. O parâmetro a*, relacionado a vermelhidão, apresentou diferença estatística significativa ($p<0,05$) entre todos os hidrolisados, apresentando maior cor avermelhada em 30 min. Observou-se um aumento do valor b*, sendo que os tempos 90 min e 120 min (17,81 e 18,25 respectivamente) apresentaram uma maior tendência ao amarelo (valores +). Os valores do Croma para os hidrolisados ficaram entre 14,70 a 18,25, e para ângulo-hue foram encontrados valores de 1,24 a 1,31, ressaltando mudança de tonalidade. As alterações parecem indicar que a cor do hidrolisado de proteína de plasma suíno é positivamente influenciada pelo tratamento enzimático com a protease alcalina.

Tabela 8 – Cor instrumental dos hidrolisados de plasma suíno obtidos com uso da protease alcalina e em diferentes tempos.

Tempo (min)	L*	a*	b*	C*	h
0	29,68 ± 0,04 ^d	4,81 ± 0,06 ^b	13,90 ± 0,05 ^e	14,70 ± 0,03 ^e	1,24 < 0,01 ^c
15	30,24 ± 0,20 ^c	4,09 ± 0,18 ^a	15,87 ± 0,13 ^d	16,39 ± 0,08 ^d	1,32 ± 0,01 ^a
30	31,12 ± 0,08 ^b	5,46 ± 0,19 ^c	16,38 ± 0,23 ^c	17,26 ± 0,16 ^c	1,25 ± 0,01 ^c
60	31,07 ± 0,16 ^b	4,81 ± 0,16 ^b	16,83 ± 0,03 ^{bc}	17,50 ± 0,02 ^{bc}	1,29 ± 0,01 ^{ab}
90	31,11 ± 0,08 ^b	5,23 ± 0,13 ^{ab}	17,03 ± 0,02 ^b	17,81 ± 0,02 ^b	1,27 ± 0,01 ^{bc}
120	31,81 ± 0,11 ^a	4,80 ± 0,06 ^b	17,61 ± 0,10 ^a	18,25 ± 0,08 ^a	1,30 < 0,01 ^{ab}

*Médias seguidas por letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

4.3.6 Tamanho das frações peptídicas através da eletroforese SDS-PAGE

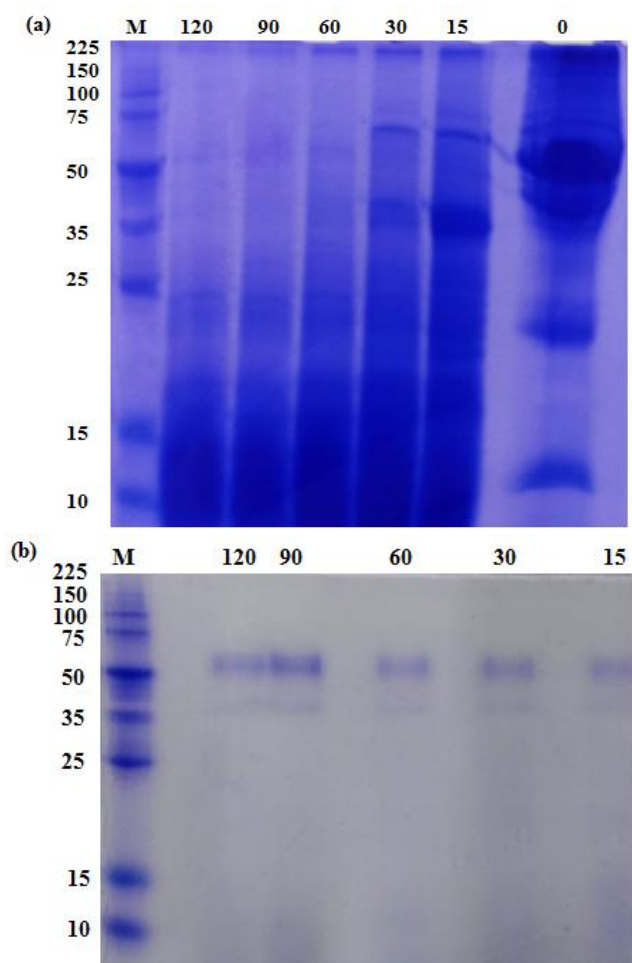
A Figura 9 mostra o resultado obtido para a análise de eletroforese SDS-PAGE, sendo na Figura 9a as bandas correspondentes aos hidrolisados em 0 min, 15 min, 30 min, 60 min, 90 min e 120 min, nas condições otimizadas e com 5% de substrato e na Figura 9b, as mesmas amostras (exceto o tempo zero) porém diluídas e padronizadas para se obter uma concentração de 5,0 mg.mL⁻¹.

Para a amostra sem hidrólise (tempo zero, Figura 9a), observou-se várias bandas de proteínas maiores do que 35 kDa. É visível também peptídeos gerados em torno de 20 kDa, além de uma banda de menor massa molecular em 10 kDa. Para as amostras hidrolisadas, observou-se uma zona de manchas maiores nos hidrolisados de 15 min e 30 min, que

compreendem todas as massas moleculares do marcador (10 a 225 kDa). Para os hidrolisados de 60 min, 90 min e 120 min, verificou-se uma diminuição de manchas acima de 35 kDa e uma concentração abaixo de 25 kDa, indicando que as proteínas foram clivadas, gerando peptídeos de tamanho abaixo de 25 kDa, com um região mais concentrada abaixo de 15 kDa.

Os hidrolisados obtidos na condição otimizada continham entre 18,80 e 21,23 mg de proteína.mL⁻¹, e estes foram diluídos até uma concentração de 5 mg.mL⁻¹ para melhor separação e visualização das bandas, o que resultou em bandas bem definidas próximas a 50 kDa e ainda alguns peptídeos com massas moleculares próximas a 35 kDa (Figura 9b), demonstrando que em relação ao tamanho dos peptídeos, ocorreu o mesmo comportamento mostrado na curva cinética da hidrólise, ou seja, após 15 min não houve mais incremento de GH e para todos os tempos da Figura 9b as bandas foram semelhantes.

Figura 9 – Eletroforese SDS-PAGE dos hidrolisados de plasma suíno obtidos em 0 min, 15 min, 30 min, 60 min, 90 min e 120 min, nas condições otimizadas e com 5% de substrato (a) e das mesmas amostras (exceto o tempo zero) porém diluídas e padronizadas para se obter uma concentração de 5,0 mg.mL⁻¹ (b), utilizando marcador de massa molecular de proteína de ampla faixa (M).



O perfil de massa molecular do sangue suíno hidrolisado por diferentes proteases foi determinado por Verma et al. (2019). A avaliação demonstrou o desaparecimento de bandas de proteínas maiores do que 50 kDa, correspondente ao sangue suíno bruto (sem hidrólise). O maior número de bandas de menor massa molecular teve correlação com o maior GH. Sangue hidrolisado com Alcalase® e Papaína apresentaram bandas em torno de 14,2 kDa. O uso da Tripsina na hidrólise levou ao aparecimento de bandas de proteínas menores que 14,2 kDa, sendo também a enzima que apresentou o maior GH.

Os perfis de hidrólise de plasma de veados, ovelhas e suínos usando papaína, bromelaína, FP400 e FP11 (proteases fúngicas) em 1 h, 2 h, 4 h e 24 h foram visualizados usando SDS-PAGE por Bah et al. (2015a). A albumina, com uma massa molecular de aproximadamente 68 kDa é o componente principal no plasma dos veados, ovelhas e suínos, juntamente com globulinas de menor abundância. Para os hidrolisados de plasma de veados e suínos utilizando FP400 e FP11, a albumina e outras proteínas foram extensivamente hidrolisadas após 24 horas abaixo do limite de resolução de 3,5 kDa, concluindo que as proteases fúngicas necessitam de um tempo mais longo de hidrólise utilizando tal substrato.

Foi relatado por Bah et al. (2013) uma comparação entre o tamanho de peptídeos a partir de hidrolisados suínos (plasma, hemoglobina, albumina e globina) com a atividade antioxidante (diferentes métodos), mostrando que peptídeos <3 kDa parecem ter maior atividade antioxidante do que os peptídeos maiores em termos de poder redutor, radical DPPH, radical hidroxila e atividades de eliminação de radical superóxido. A atividade antioxidante dos hidrolisados de plasma suíno, por exemplo, foi menor para a fração peptídica acima de 10 kDa. Tem sido sugerido que a capacidade antioxidante dos biopeptídeos *in vitro* depende do tamanho do peptídeo, da composição de aminoácidos do peptídeo e da presença de aminoácidos livres dentro dos hidrolisados (RYAN et al., 2011).

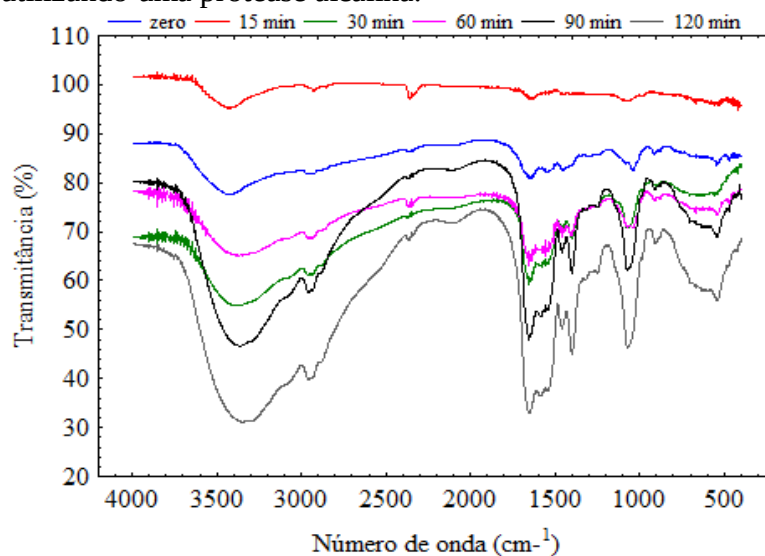
Também foram relatados por Adje et al. (2011); Bah et al. (2013); Hyun; Shin (2000) o tamanho dos peptídeos com atividade inibitória da ECA de diversas fontes de sangue. Albumina bovina apresentou atividade com peptídeo <1kDa e hemoglobina bovina apresentou atividade com peptídeos de pesos moleculares de 4,4, 3,6 e 1,5 kDa.

Diante do exposto, peptídeos alimentares que exibem funções fisiológicas relevantes no sustento da saúde humana, afetando os principais sistemas do corpo humano podem ser considerados funcionais e são classificados em tamanho, possuindo de 2 a 20 resíduos de aminoácidos e sua bioatividade é baseada em sua composição de aminoácidos e localização dentro da sequência de aminoácidos que formam o peptídeo (LI-CHAN, 2015; OZUNA et al., 2015; UDENIGWE; ALUKO, 2012).

4.3.7 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) dos hidrolisados de plasma suíno

Os espectros de infravermelho (FTIR) dos hidrolisados com protease alcalina nos tempos 0 min, 15 min, 30 min, 60 min, 90 min e 120 min estão mostrados na Figura 10. Comparando os espectros de FTIR dos hidrolisados obtidos nos diferentes tempos, a posição dos picos de absorção e intensidade de absorção foi alterada de alguma forma. Comparando o hidrolisado do tempo zero e do tempo 15 min, pode-se observar uma diferença nos espectros das quatro outras frações de hidrolisado. Ainda, o espectro do hidrolisado do tempo de 90 min e do tempo de 120 min difere do espectro do hidrolisado do tempo zero (sem hidrólise). Além disso, as bandas entre 900 e 1000 cm^{-1} se intensificam, indicando maior número de ligações simples, o que confirma que houve mudança após a hidrólise da protease alcalina, ou seja, a quebra das ligações entre os aminoácidos constituintes das proteínas do plasma.

Figura 10 - Espectros de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) de plasma suíno utilizando uma protease alcalina.



Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

Como mostrado no espectro de FTIR, as bandas entre 3300 e 3400 cm^{-1} é atribuída à vibração de alongamento de OH. As bandas variando de 2940 e 2960 cm^{-1} representam estiramento simétrico de CH, CH₃ e alongamento assimétrico de CH₂. Os picos em 1654 cm^{-1} são atribuídos à banda amida I (dois tipos de ligações de hidrogênio em um grupo C=O com o grupo NH da cadeia adjacente e o grupo OH da inter-cadeia). A banda amida I, que se situa na região de 1600 e 1700 cm^{-1} , é a estrutura proteica mais útil para a espectroscopia de infravermelho, uma vez que envolve vibrações de estiramento C=O de grupos peptídicos (HALIM; YUSOF; SARBON, 2016). A banda amida II (inclinação no plano N-H e modo de estiramento C-N) e a banda amida III

(modo de plano do grupo CONH) são observadas a 1556 e entre 1400 cm^{-1} , respectivamente, e as bandas em torno de 1076 cm^{-1} são atribuídas ao oxigênio da ponte assimétrica e ao estiramento de C-O.

4.3.8 Atividade antimicrobiana

As atividades antimicrobianas de todos os hidrolisados, nos diferentes tempos, foram avaliadas contra bactérias Gram-positivas (*S. aureus*, *B. cereus* e *L. monocytogenes*) e Gram-negativas (*S. Enteritidis* e *E. coli*), não apresentando esta atividade, quando comparados aos antibióticos convencionais. Até o momento, os peptídeos com atividades antimicrobianas da fração plasmática do sangue animal não foram relatados, como também observado no estudo realizado por Bah et al. (2015b), que utilizaram plasma separado de sangue de veado, ovelha e porco, hidrolisados com preparações de protease de fontes de plantas (papaína e bromelina) e fúngicas (FP400 e FP11).

Verma et al. (2019) testaram a atividade antimicrobiana de hidrolisados de sangue porcino, obtidos a partir do uso de diferentes proteases e em 6 h de reação, contra *E. coli*, *B. cereus*, *S. aureus* e *L. monocytogenes*. O hidrolisado obtido com o uso de Tripsina exibiu atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes* (halo de inibição de 22,58 mm) seguida de inibição do *S. aureus* (halo de inibição de 18,22 mm), *E. coli* (halo de inibição de 17,15 mm) e *B. cereus* (halo de inibição de 16,40 mm). O hidrolisado de papaína também apresentou maior eficácia antimicrobiana contra *L. monocytogenes* (halo de inibição de 16,45 mm), *E. coli* (halo de inibição de 16,35 mm), *S. aureus* (halo de inibição de 14,45 mm) e *B. cereus* (halo de inibição de 12,73 mm). A atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e *B. cereus* foi semelhante para os hidrolisados utilizando a papaína e a Alcalase®.

Alguns autores relatam que os peptídeos antimicrobianos podem ser derivados dos fragmentos de hemoglobina de glóbulos vermelhos animais, incluindo a hidrólise da hemoglobina bovina (ADJE et al., 2011; FROIDEVAUX et al., 2001), ou dos neutrófilos (glóbulos brancos) separados do sangue animal (ANDERSON; YU, 2008; TREFFERS et al., 2005; WESSELY-SZPONDER; MAJER-DZIEDZIC; SMOLIRA, 2010).

Um dos possíveis motivos para tais hidrolisados não apresentarem atividade antimicrobiana pode ocorrer porque os peptídeos que contribuem para os mecanismos de ação antimicrobiana não estão disponíveis nessas proteínas plasmáticas, ou não foram disponibilizados por hidrólise usando a protease deste estudo. Além disso, os peptídeos com atividade antimicrobiana podem ser produzidos após os tempos de hidrólise testados, e as

sequências de aminoácidos gerados não possuem atividades antimicrobianas em relação aos micro-organismos testados neste estudo (BAH et al., 2016).

Estudos foram realizados isolando e sequenciando peptídeos antimicrobianos de sangue de bovinos, suínos, ovinos, caprinos e cervinos. A hidrofobicidade do peptídeo demonstrou estar relacionada com a atividade antimicrobiana, sendo responsável na ligação de lipopolissacáridos na membrana celular externa da bactéria. Os autores concluíram que a tirosina (Y), a arginina (R) e um aminoácido básico com carga positiva, como a lisina (K) ou a histidina (H), são necessários para a atividade antibacteriana (CATIAU et al., 2011). Peptídeos antibacterianos de neutrófilos de sangue animal poderiam ser significativamente mais ativos em combinação, recomendando que melhores resultados possam ser obtidos se os peptídeos isolados forem usados sinergicamente (ANDERSON; YU, 2008; WESSELY-SZPONDER; MAJER-DZIEDZIC; SMOLIRA, 2010).

4.3.9 Atividade antioxidante

4.3.9.1 Atividade de eliminação de radicais DPPH

O ensaio da atividade de eliminação de radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) tem sido amplamente utilizado para avaliar a propriedade antioxidante de várias moléculas. As atividades de eliminação de DPPH, dos hidrolisados obtidos em 15 min, 30 min, 60 min, 90 min e 120 min de reação, diluídos em concentrações de 0,1 a 5,0 mg.mL⁻¹, são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Atividade antioxidante referente a eliminação de radicais DPPH dos hidrolisados de plasma suíno obtidos com protease alcalina em diferentes tempos e concentrações de proteína solúvel.

Concentração de proteína solúvel (mg.mL ⁻¹)	Tempo (min)				
	15	30	60	90	120
[5,0]	36,73 ± 0,16 ^{aC}	37,01 ± 0,24 ^{aC}	37,93 ± 1,05 ^{aBC}	40,79 ± 0,89 ^{aAB}	43,82 ± 0,97 ^{aA}
[4,0]	34,27 ± 0,57 ^{aC}	35,58 ± 0,97 ^{aBC}	36,27 ± 0,65 ^{aABC}	38,22 ± 1,13 ^{aAB}	39,70 ± 0,97 ^{bA}
[3,0]	29,63 ± 0,81 ^{bB}	30,84 ± 0,57 ^{bAB}	31,06 ± 0,40 ^{bAB}	31,69 ± 0,32 ^{bAB}	32,55 ± 0,57 ^{cA}
[2,0]	18,25 ± 1,05 ^{cD}	22,14 ± 0,24 ^{cC}	23,17 ± 0,73 ^{cBC}	25,97 ± 0,81 ^{cAB}	28,20 ± 0,89 ^{dA}
[1,5]	10,24 ± 0,57 ^{dC}	10,76 ± 0,49 ^{dC}	12,30 ± 0,08 ^{dBC}	13,99 ± 0,85 ^{dB}	16,65 ± 0,73 ^{eA}
[1,0]	4,23 ± 0,97 ^{eD}	6,21 ± 0,85 ^{eCD}	8,58 ± 0,65 ^{eBC}	9,84 ± 1,13 ^{eAB}	12,04 ± 0,20 ^{fA}
[0,5]	0,51 ± 0,24 ^{fC}	1,49 ± 0,49 ^{fC}	4,00 ± 0,32 ^{fB}	5,38 ± 0,49 ^{fAB}	6,12 ± 0,08 ^{gA}
[0,1]	0,11 ± 1,29 ^{fA}	0,11 ± 0,49 ^{fA}	0,34 ± 1,38 ^{gA}	1,20 ± 0,24 ^{gA}	1,54 ± 0,57 ^{hA}
EC ₅₀	5,392 ^D	5,258 ^{CD}	5,171 ^C	4,903 ^B	4,660 ^A

* Médias seguidas por letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

**Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

Em relação a porcentagem de eliminação do radical DPPH, verificou-se que as maiores porcentagens foram obtidas para os hidrolisados de plasma de 90 min e 120 min de reação e 5 mg.mL⁻¹ de proteína solúvel. O experimento conduzido por 120 min corresponde ao maior GH obtido, que foi de 42,47%. Pode-se verificar uma tendência de aumento da porcentagem de eliminação do radical DPPH com o aumento do GH, para todas as concentrações testadas. Os hidrolisados proteicos reduziram o radical DPPH a um composto amarelo, aparentemente devido ao radical DPPH aceitar um elétron ou hidrogênio para se tornar uma molécula estável, e esta atividade foi melhorada gradualmente com o aumento do tempo de hidrólise.

O termo EC₅₀ foi usado para avaliar os efeitos de eliminação de radicais livres, definido como a concentração do composto para o qual 50% do efeito de atividade antioxidante é observado. Menor EC₅₀ indica maior efeito de eliminação de radicais livres. O menor valor de EC₅₀ para os hidrolisados dos tempos avaliados foi obtido para o hidrolisado de plasma de 120 min, e este diferiu estatisticamente dos demais (p<0,05). Observou-se que não houve diferença estatística no EC₅₀ dos hidrolisados de 15 min e 30 min e nos hidrolisados de 30 min e 60 min, indicando que conforme o tempo de hidrólise aumenta, a atividade antioxidante também aumenta.

Observações similares da eliminação do DPPH também foram relatadas por Verma et al. (2019), realizando hidrólise enzimática de sangue suíno com Alcalase®. O hidrolisado obtido após 120 min de reação apresentou uma porcentagem de inibição de 28,86±0,37, equiparando-se ao valor encontrado na concentração de 2,0 mg.mL⁻¹ em 120 min, do presente estudo.

A atividade de eliminação de radicais DPPH utilizando plasma suíno hidrolisado com uso de Alcalase® foi relatada por Liu et al. (2010), correspondendo a atividade sequestradora de 31,30%, 45,40% e 76,80%, para os hidrolisados obtidos nos tempos 30 min, 120 min e 300 min de reação, respectivamente, corroborando os resultados obtidos no presente estudo.

Na pesquisa de Bah et al. (2015b), o plasma separado de sangue de suíno foi hidrolisado separadamente, utilizando preparações de protease de fontes de plantas (papaína e bromelina) e fúngicas (FP400 e FPII). Para o tempo de hidrólise de 120 min, o hidrolisado de plasma obtido apresentou uma atividade de eliminação de radicais DPPH de 27,93%, 18,62%, 34,00% e 19,03% quando utilizada a papaína, bromelina, FP400 e FPII, respectivamente. Tais resultados são semelhantes aos obtidos no presente estudo para plasma suíno e protease alcalina.

Damgaard et al. (2014) testaram a capacidade antioxidante de sete diferentes hidrolisados de tecido suíno (cólon, apêndice, reto, pâncreas, coração, fígado e pulmão), a 5 mg.mL⁻¹ e 120 min de reação, utilizando uma mistura de Protamex® e Alcalase®. O hidrolisado

do coração mostrou a mais forte capacidade de eliminação de DPPH (25,40%), seguido pelo hidrolisado de cólon (17,60%), pelo hidrolisado de apêndice (17,10%), pelo hidrolisado de pâncreas (13,40%) e pelo hidrolisado de reto (12,10%). Os hidrolisados de fígado e pulmão exibiram a capacidade de eliminação de DPPH mais fraca (9,90% e 9,70%, respectivamente). Os resultados citados são inferiores aos encontrados no presente estudo, se comparados a mesma concentração de proteína solúvel e o mesmo tempo de hidrólise. Cabe ressaltar que a combinação de enzimas pode ser uma boa opção a ser testada, visando o aumento de determinadas capacidades.

Como já relatado, a enzima utilizada nesse capítulo (protease alcalina) atua como uma endopeptidase, clivando ligações peptídicas no interior da cadeia, produzindo principalmente polipeptídeos de tamanho pequeno e médio, alguns dos quais apresentaram atividade antioxidante (CUMBY et al., 2008). As diferenças de atividades de eliminação de radicais entre os hidrolisados podem ser atribuídas às composições de aminoácidos, distribuições moleculares e as estruturas e sequências de peptídeos (SARMADI; ISMAIL, 2010).

A maioria dos peptídeos com atividade antioxidante extraídos de fontes alimentares apresenta massas moleculares variando de 0,5 a 1,8 kDa (JE et al., 2007; WU; CHEN; SHIAU, 2003) e contém resíduos de aminoácidos hidrofóbicos como Leu ou Val no terminal N dos peptídeos, e Tyr, Lys, His, Trp, Pro e Met dentro de suas sequências (GÜLÇİN et al., 2006; WU; CHEN; SHIAU, 2003). No entanto, mais pesquisas são necessárias para explicar a relação entre estrutura e função de peptídeos antioxidantes.

Para os peptídeos bioativos da proteína alimentar serem excelentes fontes de antioxidantes, eles devem ter duas propriedades estruturais básicas. Uma delas é a presença de elétrons de anel ou de elétrons extras ou aromáticos que podem estar em várias configurações estáveis. Os elétrons extras podem ser doados para desativar os radicais livres, enquanto o anel aromático assegura que a perda de elétrons não altere o peptídeo para outro radical livre. A presença de vários resíduos de aminoácidos na cadeia peptídica pode aumentar a propriedade antioxidante como resultado dos efeitos aditivos em termos de transferência de elétrons para os radicais livres. A segunda propriedade é a posse do caráter justamente hiperfóbico, que aumenta a translocação através da estrutura da membrana das células bilipídeas para o citoplasma da célula e mitocôndrias, onde os radicais livres são gerados (UDENIGWE; ALUKO, 2012).

4.3.9.2 Poder antioxidante redutor de ferro

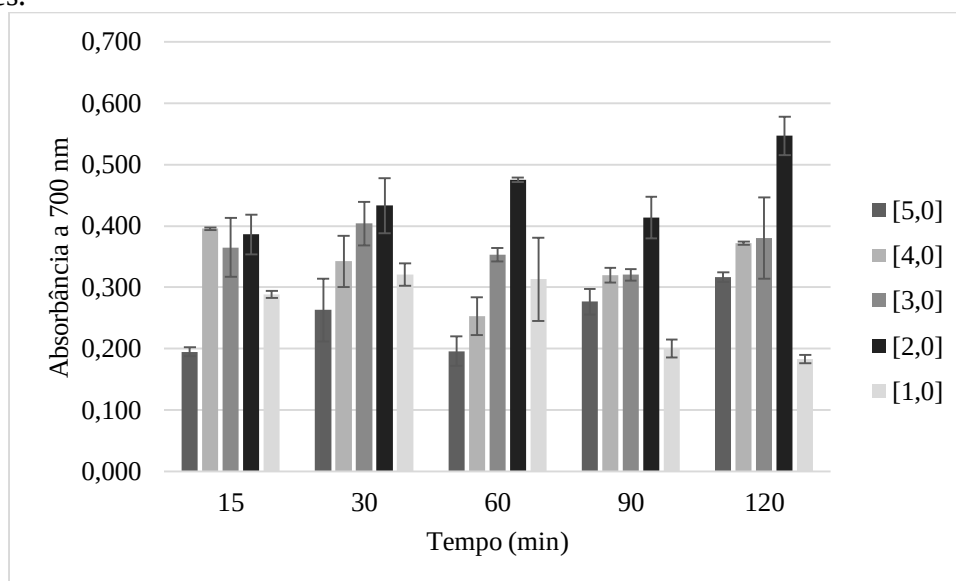
O poder antioxidante redutor de ferro foi avaliado para determinar a capacidade de uma amostra doar elétrons ou prótons, expresso como a capacidade de reduzir o complexo $\text{Fe}^{3+}/$

ferricianeto para a forma Fe^{2+} , que foi monitorada quanto à absorbância do azul da Prússia a 700 nm (CUMBY et al., 2008).

O ferricianeto de potássio é amplamente utilizado para avaliar a capacidade redutora de hidrolisados cuja absorção mais alta indica maior formação de íons ferrosos como resultado da redução de íons férricos a íons ferrosos denotando maior poder redutor. Esta propriedade é uma indicação da capacidade do hidrolisado de servir como agente redutor nas reações redox, mostrando relação entre a capacidade redutora do hidrolisado e sua atividade antioxidante (ARISE; YEKEEN; EKUN, 2016).

O poder antioxidante redutor de ferro dos hidrolisados de plasma suíno obtidos com protease alcalina são apresentados na Figura 11. O hidrolisado com concentração de proteína solúvel de $2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ apresentou o maior poder redutor ($0,547 \pm 0,03$), enquanto o hidrolisado com concentração de proteína solúvel de $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ apresentou o menor poder redutor ($0,183 \pm 0,01$), ambos obtidos em 120 min de hidrólise.

Figura 11 – Poder redutor dos hidrolisados de plasma suíno analisados em diferentes tempos e concentrações.



Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

O poder redutor dos hidrolisados proteicos de plasma suíno deveu-se possivelmente à presença de peptídeos ou aminoácidos, que funcionavam como doadores de elétrons e podiam reagir com radicais livres para formar produtos mais estáveis. Hidrolisados de proteínas com maior poder redutor têm melhores habilidades para doar elétron ou hidrogênio e servem como um indicador significativo de seu potencial para uso como antioxidante (CHALAMAIH et al., 2013).

Hidrolisados de hemoglobina suína foram preparados através de hidrólise com Alcalase® por Chang; Wu; Chiang (2007), e o poder redutor na concentração de 5 mg.mL⁻¹ foi de 0,380, após 120 min de hidrólise. Valor próximo foi encontrado no estudo, que foi de 0,317, para a mesma concentração e tempo de hidrólise. Caseinato de sódio foi hidrolisado por papaína, pancreatina e tripsina e o poder redutor após 60 min de hidrólise foi de 0,185, 0,203 e 0,216, respectivamente. Tais valores se equiparam quando comparado a concentração de 5,0 mg.mL⁻¹ (0,196) no mesmo tempo de hidrólise (LUO; PAN; ZHONG, 2014).

A atividade antioxidante apresentada pelos hidrolisados proteicos pode atuar na proteção contra danos celulares e doenças crônicas relacionadas ao estresse oxidativo. Na indústria de alimentos podem ser empregados na prevenção de reações de oxidação (como peroxidação lipídica) que levam a diminuição da vida útil, deterioração da qualidade nutricional e sensorial de alimentos (CORRÊA, 2013).

4.3.10 Ensaio de inibição da α -amilase e da α -glucosidase (atividade antidiabética)

O potencial de peptídeos produzidos pela hidrólise enzimática de proteínas para exibir bioatividades benéficas à saúde tem recebido atenção considerável em pesquisas, incluindo a atividade antidiabética. Para a determinação da atividade antidiabética *in vitro* dos hidrolisados foi feito o estudo da atividade inibitória em duas enzimas: α -amilase e α -glucosidase. Estas enzimas catalisam a hidrólise de carboidratos complexos em açúcares simples, como maltose, maltotriose e glicose.

Por ser responsável pela digestão do amido, a inibição destas no processo digestivo pode atrasar significativamente a digestão e a absorção de carboidratos e, portanto, é uma abordagem importante no controle do diabetes. Com o aumento contínuo da incidência de diabetes tipo 2, é importante explorar componentes alimentares, como hidrolisados proteicos, com atividade inibitória da amilase como potenciais alternativas aos medicamentos comerciais (BERNFELD, 1951; URAIPONG; ZHAO, 2016). A atividade inibitória dos hidrolisados de plasma suíno obtidos em diferentes tempos e em diferentes concentrações, contra α -amilase estão apresentados na Tabela 10.

Os resultados evidenciam que para todas as concentrações testadas, exceto para a concentração a 1,0 mg.mL⁻¹, não se obteve diferença estatística no percentual de inibição de α -amilase para os hidrolisados obtidos nos diferentes tempos de reação. Para a concentração a 1,0 mg.mL⁻¹, o hidrolisado de 90 min e o hidrolisado de 120 min diferiram significativamente ($p < 0,05$) do hidrolisado de 30 min. Quando se compara entre as concentrações testadas para um mesmo tempo de reação, verificou-se que houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$)

entre as concentrações, mostrando que para as concentrações a partir de 1,0 mg.mL⁻¹, a porcentagem de inibição da α -amilase aumentou.

Tabela 10 - Percentual de inibição de α -amilase pelo plasma suíno em diferentes concentrações e tempos de hidrólise.

Concentração de proteína solúvel (mg.mL ⁻¹)	Tempo (min)				
	15	30	60	90	120
[2,0]	1,88 ± 0,27 ^{aA}	2,09 ± 0,33 ^{aA}	2,08 ± 0,41 ^{aA}	2,16 ± 0,45 ^{aA}	2,21 ± 0,25 ^{aA}
[1,5]	1,32 ± 0,21 ^{abA}	1,50 ± 0,36 ^{abA}	1,55 ± 0,21 ^{abA}	1,71 ± 0,35 ^{abA}	1,78 ± 0,36 ^{abA}
[1,0]	1,04 ± 0,13 ^{bAB}	0,84 ± 0,13 ^{bcB}	1,17 ± 0,13 ^{bAB}	1,19 ± 0,12 ^{bcA}	1,29 ± 0,12 ^{bA}
[0,5]	0,32 ± 0,28 ^{cA}	0,39 ± 0,27 ^{cA}	0,34 ± 0,29 ^{cA}	0,46 ± 0,24 ^{cdA}	0,61 ± 0,14 ^{cA}
[0,1]	0,24 ± 0,24 ^{cA}	0,39 ± 0,36 ^{cA}	0,25 ± 0,25 ^{cA}	0,15 ± 0,13 ^{dA}	0,15 ± 0,13 ^{cA}

* Médias seguidas por letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

**Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

Para os ensaios de inibição da α -glucosidase (Tabela 11), os resultados revelaram pouca ou nenhuma atividade inibitória dos hidrolisados, para as concentrações abaixo de 1,0 mg.mL⁻¹.

Tabela 11 - Percentual de inibição de α -glucosidase pelo plasma suíno em diferentes concentrações e tempos de hidrólise.

Concentração de proteína solúvel (mg.mL ⁻¹)	Tempo (min)				
	15	30	60	90	120
[2,0]	1,28 ± 0,51 ^{aA}	1,36 ± 0,56 ^{abA}	1,58 ± 0,48 ^{aA}	1,58 ± 0,50 ^{aA}	1,62 ± 0,52 ^{aA}
[1,5]	1,19 ± 0,03 ^{aA}	1,41 ± 0,52 ^{aA}	1,23 ± 0,02 ^{aA}	1,40 ± 0,47 ^{aA}	1,15 ± 0,03 ^{aA}
[1,0]	0,94 ± 0,82 ^{abA}	1,00 ± 0,86 ^{abA}	0,95 ± 0,82 ^{abA}	1,01 ± 0,87 ^{abA}	0,00 < 0,01 ^{bA}
[0,5]	0,00 < 0,01 ^{bB}	0,00 < 0,01 ^{bB}	0,00 < 0,01 ^{bB}	0,00 < 0,01 ^{bB}	1,01 ± 0,76 ^{abA}
[0,1]	0,00 < 0,01 ^{bA}	0,00 < 0,01 ^{bA}	0,00 < 0,01 ^{bA}	0,00 < 0,01 ^{bA}	0,00 < 0,01 ^{bA}

* Médias seguidas por letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

**Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

Proteínas de sementes de melancia (*Citrullus lanatus* L.) foram hidrolisadas usando Pepsina e Tripsina e investigados quanto à propriedade inibitória da α -amilase. De uma maneira dependente da concentração, os hidrolisados demonstraram capacidade inibidora potente da α -amilase com Alcalase® nas concentrações 0,5; 1,0; 1,5; e 2,0 mg.mL⁻¹ de 71,40%, 76,41%, 78,52% e 86,00% respectivamente. (ARISE; YEKEEN; EKUN, 2016).

Silva (2017) avaliou a inibição da α -glucosidase e α -amilase obtidos da hidrólise de clara de ovo de galinha de capoeira por proteases produzidas por *Aspergillus avenaceus* URM 6706, sendo testadas a atividade dos hidrolisados com massa molecular menor que 3 kDa em

diferentes concentrações. Para α -glucosidase nas concentrações 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78 e 0,39 mg.mL⁻¹ a atividade inibitória foi de 66,66%; 60,78%; 56,86%; 56,82%; 17,64%; 0,00%; 0,00%; e 0,00% respectivamente. E para α -amilase nas mesmas concentrações a atividade inibitória foi de 8,30%; 14,20%; 33,13%; 40,51%; 34,52%; 32,38%; 32,38%; e 24,42%.

A inibição da α -amilase e a α -glucosidase do hidrolisado proteico obtido de semente de *Luffa cylindrica* utilizando Alcalase® foi estudada. O hidrolisado expressou uma inibição significativa contra a atividade enzimática da α -amilase a 1,00 mg.mL⁻¹ de 36,36%. O hidrolisado de Alcalase® mostrou atividade inibitória significativa contra a α -glucosidase, na qual a maior porcentagem de inibição alcançada pelo hidrolisado de Alcalase® foi de 65,82% a 1,00 mg.mL⁻¹ (OLUSANYA et al., 2019).

Porcentagens de inibição próximas ao dos estudos anteriores também foram relatadas em pesquisas com fontes de hidrolisados como feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) (DE SOUZA ROCHA et al., 2015; OSEGUERA-TOLEDO; GONZALEZ DE MEJIA; AMAYALLANO, 2015), feijão branco (PEREIRA, 2011), variedades de pimenta (OBOH; ADEMILUYI; FALOYE, 2011), gema de ovo (ZAMBROWICZ et al., 2015), clara de ovos (SILVA, 2017), extratos de Labiatae (ROUZBEHAN et al., 2017), extrato de folhas de *Mouriri elliptica* Martius (SILVA, 2016), frutas nativas (BALISTEIRO, 2013), frutos da família Myrtaceae (PACHECO, 2015), farelo de arroz (URAIPOG; ZHAO, 2016), lentilha (*Lens culinaris*) (CASARIN, 2018) e extratos aquosos de plantas selvagens da região do Algarve (Portugal) (VIEGAS, 2017). Tais estudos relatam que os efeitos hipoglicemiantes destas fontes ocorrem principalmente pela presença dos metabólitos secundários que estão envolvidos em processos de defesa e proteção, como esteroides, flavonóides (polifenóis), taninos, terpenos, triterpenóides, alcaloides, antocianinas, entre outros.

4.3.11 Atividade inibitória da enzima conversora da angiotensina (ECA) (atividade anti-hipertensiva)

A atividade inibitória da ECA pelos hidrolisados de plasma suíno utilizando a protease alcalina é apresentada na Tabela 12. Os hidrolisados apresentaram aumento na atividade inibitória da ECA até o tempo de 90 min, sendo a atividade obtida para os hidrolisados dos tempos de 30 min, 60 min e 90 min, iguais estatisticamente ($p > 0,05$).

Os resultados mostram que existe um tempo crítico de reação, no qual são liberados os peptídeos inibidores da ECA mais potentes. A atividade dos peptídeos presentes em relação a ECA, é afetada principalmente pela estrutura molecular, incluindo a composição e

comprimento da sequência dos aminoácidos (ELAVARASAN; SHAMASUNDAR, 2014; LASSOUED et al., 2015).

Tabela 12 - Atividade inibitória da ECA de plasma suíno preparado com protease alcalina influenciados pelo tempo de hidrólise.

Concentração de proteína solúvel (mg.mL ⁻¹)	Tempo (min)				
	15	30	60	90	120
[2,0]	6,18 ± 0,30 ^{BC}	7,32 ± 0,10 ^{ABC}	8,10 ± 0,80 ^{AB}	8,66 ± 0,60 ^A	5,40 ± 0,20 ^C

*Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

A relação (E/S) também foi considerada ser um fator importante na obtenção de hidrolisados com maior atividade inibitória da ECA. Wei e Chiang (2009) relataram que a atividade inibitória da ECA dos hidrolisados de sangue suíno aumentou com o aumento da relação E/S, na qual uma relação E/S de 1:5 produziu hidrolisados com a maior atividade inibitória quando comparada com os hidrolisados das razões E/S de 1:10 e 1:100.

Bougatef et al. (2008) investigaram as atividades inibitórias da enzima conversora da angiotensina I (ECA) dos hidrolisados proteicos preparados a partir de cabeças e vísceras de sardinha (*Sardinella aurita*) e com várias proteases, e concluíram que o maior GH não garantiu a maior atividade inibitória da ECA, corroborando com os dados deste estudo, no qual o maior GH foi observado para o hidrolisado de 120 min, porém este apresentou a menor porcentagem de inibição da ECA.

Hidrolisados de proteína de semente de data (*P. dactylifera* L.) foram preparados utilizando Alcalase®, Flavourzyme® e Thermolysin e testados quanto à sua atividade inibidora de ECA. Neste estudo, a combinação de duas ou mais enzimas elevou a produção de hidrolisados com alta atividade inibitória da ECA, quando comparados aos hidrolisados obtidos com uma única enzima (AMBIGAIPALAN; AL-KHALIFA; SHAHIDI, 2015). A variação da atividade inibitória da ECA desses peptídeos pode ser atribuída às suas diferentes composições de aminoácidos e a hidrofobicidade. Resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (leucina, valina, alanina, triptofano, tirosina, prolina e fenilalanina) preferencialmente ligam-se a locais catalíticos da ECA, atuando assim como inibidores (AHN et al., 2012). Todos esses aminoácidos encontram-se presentes na amostra de plasma suíno, exceto pelo triptofano conforme pode ser observado na Tabela 1 do capítulo I.

Houve uma diferença significativa na atividade da ECA entre os hidrolisados obtidos em diferentes tempos de reação, indicando que a enzima utilizada para a hidrólise leva a hidrolisados cuja capacidade de inibição é variada, quando comparada a outros estudos. No

entanto, uma vez que as proteínas não foram isoladas, pode ter havido interferência de outras biomoléculas. Assim, mais estudos são necessários para purificar as proteínas de plasma suíno, fracionar os peptídeos resultantes e identificar suas sequências. Barbana; Boye (2011); Rui et al. (2013) relataram que os próprios hidrolisados podem ser utilizados como fontes comerciais de compostos inibitórios da ECA, porém observou-se que a atividade inibitória é mais elevada em peptídeos purificados.

4.4 Conclusão

O presente estudo mostra que o plasma suíno é uma boa opção de geração de peptídeos com bioatividades variadas quando utilizada protease alcalina como biocatalisador da reação. Os resultados demonstram a existência da maioria das atividades testadas visando a produção de peptídeos inibitórios, como materiais para alimentos funcionais anti-hipertensivos, antidiabéticos e antioxidantes. Muitas atividades não apresentaram valores de inibição elevados quando comparados com outros autores, porém para uma melhor avaliação destas, faz-se necessário a purificação destes hidrolisados, a fim de identificar as sequências bioativas específicas.

Visando estudos subsequentes, a realização do fracionamento dos hidrolisados, buscando o isolamento e a identificação de peptídeos específicos responsáveis por cada atividade faz-se necessário. Métodos de purificação como ultrafiltração, vários tipos de cromatografia, colunas de carvão ativado e ultrafiltração por eletrodialise poderiam ser aplicadas. Além disso, a técnica de espectrometria de massa poderia ser utilizada para caracterização da estrutura e quantificação desses peptídeos bioativos, e a realização do sequenciamento dos aminoácidos dos hidrolisados dos diferentes tempos.

Ainda, são necessários estudos adicionais para investigar as atividades testadas *in vivo* e verificar a análise econômica para os processos, desde a coleta de sangue suíno até à produção de mistura de peptídeos, além da sua aceitabilidade pelo consumidor.

CAPÍTULO III

Este capítulo aborda a caracterização da matéria-prima, seguida da avaliação das condições ótimas de hidrólise utilizando uma protease ácida (Pepsina), por meio de um planejamento experimental visando maximizar o grau de hidrólise, estudo dos parâmetros cinéticos e análise da cor instrumental. Os hidrolisados foram caracterizados por análise do perfil eletroforético empregando a técnica de SDS-PAGE e avaliação estrutural através da análise de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) em diferentes tempos de ensaio. As bioatividades dos hidrolisados, incluindo, atividade antimicrobiana, atividade antioxidante (DPPH e FRAP), atividade antidiabética e anti-hipertensiva foram determinadas.

5 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO PLASMA SUÍNO UTILIZANDO UMA PROTEASE ÁCIDA E VERIFICAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO GRAU DE HIDRÓLISE NAS BIOATIVIDADES DOS HIDROLISADOS

5.1 INTRODUÇÃO

A indústria da carne tem enfrentado a tarefa de buscar uma melhor utilização de todos os produtos do abate, incluindo o sangue, encontrando novas aplicações para os componentes sanguíneos, visando eliminar o risco de poluição como também prevenir a perda de um material potencialmente valioso. O uso de sangue animal pode aumentar à medida que a deficiência mundial de proteína aumenta (ÁLVAREZ et al., 2009; LYNCH et al., 2017).

Sangue porcino, coletado de abatedouros, é uma valiosa fonte de proteína, sendo considerado resíduo, e destinado principalmente como ração animal, porém hidrolisados peptídicos podem ser produzidos acrescentando valor a este subproduto de processamento. O sangue é basicamente composto de água, células, enzimas, proteínas e outras substâncias orgânicas e inorgânicas que incluem dois componentes principais, hemoglobina (fração celular) e a proteína plasmática (BAH et al., 2013; SUN; SHEN; LUO, 2011). Segundo Pérez-Gálvez et al. (2011), o plasma, é composto principalmente de albumina, globulinas e fibrinogênio e contém 89% em proteína, 1,5% em gordura e 1,2% em cinzas.

O processo de hidrólise enzimática é um dos métodos utilizados para obtenção de peptídeos, que são pequenos fragmentos de proteína (geralmente 2-20 aminoácidos), capazes de exercer atividades biológicas benéficas. Esses pequenos fragmentos de proteínas são conhecidos como peptídeos bioativos. Dentre as bioatividades mais estudadas, destacam-se os peptídeos com atividade antidiabética, anti-hipertensiva, anticancerígena, anti-inflamatória,

antioxidante, imunomoduladora e antimicrobiana (TANZADEHPANAH et al., 2013; TOLDRÃ; MORA; REIG, 2016).

Para obtenção de hidrolisados com propriedades desejáveis é importante o controle das condições de processo que abrangem tipo de enzima, pH, temperatura, tempo de hidrólise, concentração de substrato, relação E/S e inativação enzimática no final do processo. Tais condições refletem nas atividades biológicas dos peptídeos gerados que são influenciados principalmente pela composição de aminoácidos, massa e comprimento dos peptídeos e tipo de resíduos nas terminações C e N (ALUKO et al., 2015; KARAMI; AKBARI-ADERGANI, 2019; TAVANO, 2013).

A Pepsina (EC 3.4.23.1) utilizada neste capítulo, é uma endopeptidase do ácido aspártico. Seu zimogênio, pepsinogênio, é secretado pelas células principais da mucosa gástrica e possui sua atividade maximamente ativa em pH ácido. Ataca proteínas nativas, como a hemoglobina e a albumina, em pH em torno de 2. A desnaturação das proteínas do substrato em pH baixo tem contribuído para a sua hidrólise eficiente (KAGEYAMA, 2002; LUO et al., 2018).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi obter hidrolisados de plasma suíno utilizando Pepsina e determinar as atividades antimicrobiana, antioxidante, antidiabética e anti-hipertensiva, caracterizadas como propriedades bioativas.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Reagentes

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Bioprocessos, Laboratório de Operações Unitárias, Laboratório de Microbiologia da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC) de Pinhalzinho – SC e Complexo de Laboratórios Multiusuários (UEPG) de Ponta Grossa - PR. Para este estudo foi utilizado plasma suíno (AP920) fornecido pela empresa APC do Brasil Ltda (Chapecó, SC, Brasil) e Pepsina (mucosa gástrica suína) adquirida da Sigma Aldrich, St Louis, USA. Os principais reagentes utilizados foram: tartarato de sódio e potássio, carbonato de sódio, sulfato de cobre II, hidróxido de sódio, ácido clorídrico, fosfato de sódio monobásico, fosfato de sódio dibásico, tris (hidroximetil) aminometano, ácido tricloroacético (TCA), ferricianeto de potássio, cloreto férrico, 1,1-diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH) (Aldrich, D9132), álcool etílico 95%, Folin-Ciocalteau (Sigma–Aldrich, F9252), glicerol, 2-mercaptoetanol (β ME), acrilamida, N , N , N' , N' - tetrametiletenodiamina (TEMED), bis-acrilamida, glicina, dodecil sulfato de sódio (SDS), persulfato de amônio, marcador de massa molecular de proteína de ampla faixa (10-225 Da), azul brilhante de

coomassie (R-250), ácido acético, amido solúvel, α -Amilase de *Aspergillus oryzae*, α -Glucosidase de *Saccharomyces cerevisiae*, p-nitrofenil α -D-glucosídeo (pNPG) e ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), enzima de conversão da angiotensina do pulmão de coelho (ECA), N- [3- (2- Furil) acrilóil] -o- fenilalanil- glicil- glicina (FAPGG).

5.2.2 Equipamentos

Foram utilizados os seguintes equipamentos: Banho-maria digital (Modelo SSD-5L, potência 550 W, Solidsteel, Piracicaba, SP, Brasil), Banho Dubnoff Microprocessado Digital (Modelo SL-157, SOLAB, Piracicaba, SP, Brasil), Centrífuga Refrigerada (Modelo SL-703, SOLAB, Piracicaba, SP, Brasil), Centrífuga de Bancada (Modelo K14-4000, KASVI, São José do Pinhais, PR, Brasil), pHmetro de Bancada (Modelo Q-400AS, QUIMIS, Diadema, SP, Brasil), Agitador Magnético com Aquecimento (Modelo CE-495, CienlaB, Campinas, SP, Brasil), Bloco Microdigestor de Kjeldahl Microprocessado (Modelo Q327M, QUIMIS, Diadema, SP, Brasil), Colorímetro (CR-400, Konica Minolta), espectrofotômetro UV-Vis (Modelo DR 3900, Hach), Balança Analítica (Modelo AUX220, Marte Científica, SP), Sistema de eletroforese vertical (Vert-i10), Liofilizador (Modelo TFD5503, ilShin Europe), leitora de microplaca (Kasuki Modelo DR-200BS), Ultra Freezer (IULT335D/368, Indrel Scientific, Londrina, PR), espectrofotômetro (Shimadzu FT-IR 8400, Kyoto, Japão), turbidímetro (Tecnal, Modelo TB-2000, SP) e transiluminador (TFX 35M, Life Technologies, Gibco BRL).

5.2.3 Caracterização físico-química do plasma suíno

A caracterização físico-química (teor de proteínas, lipídeos, cinzas e umidade) do plasma suíno foi obtida de acordo com os métodos da AOAC (AOAC, 2016). O teor de proteína foi determinado pelo método de Kjeldahl usando o fator de conversão de proteína de nitrogênio 6,25. O teor lipídico total foi determinado pelo método de extração Soxhlet com éter de petróleo. O teor de umidade foi analisado pelo método de evaporação a 105 °C até massa constante. O teor total de cinzas foi analisado por aquecimento da amostra em mufla a uma temperatura de 550 °C, até a massa constante. O teor de carboidratos foi estimado descontando-se de 100% a porcentagem dos demais componentes determinados analiticamente. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

5.2.4 Otimização das condições experimentais para a obtenção dos hidrolisados de plasma suíno

Para a otimização das condições reacionais de obtenção dos hidrolisados de plasma suíno, utilizou-se um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), verificando a influência de 3 variáveis experimentais. A Tabela 13 mostra as variáveis e os níveis, com valores codificados e reais do DCCR com pontos axiais, cuja resposta foi o grau de hidrólise (GH) (%).

Tabela 13 – Variáveis e níveis, com valores codificados e reais, do Delineamento Composto Central Rotacional com pontos axiais utilizado no estudo da otimização da hidrólise de plasma suíno utilizando Pepsina.

Variáveis	Níveis				
	- α	-1,0	0,0	1,0	+ α
Temperatura (°C) (x_1)	32	34	37	40	42
pH (x_2)	1,2	1,5	2,0	2,5	2,8
Agitação (rpm) (x_3)	83	100	125	150	167
$\alpha = 1,68$					

Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

Como variáveis de entrada foram investigados o pH, temperatura (°C) e agitação (rpm). Como variável de resposta foi medido o GH. Um total de 17 ensaios de hidrólise foram realizados para otimização destas variáveis e os resultados analisados estatisticamente, sendo utilizada a Metodologia de Superfície de Resposta. O delineamento com três variáveis, incluindo três repetições no ponto central, foi usado para ajustar à superfície de resposta de segunda ordem. As funções de resposta foram relacionadas às variáveis de entrada por um polinômio de segundo grau, conforme a Equação 9:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=2}^k \beta_{ij} x_i x_j \quad (9)$$

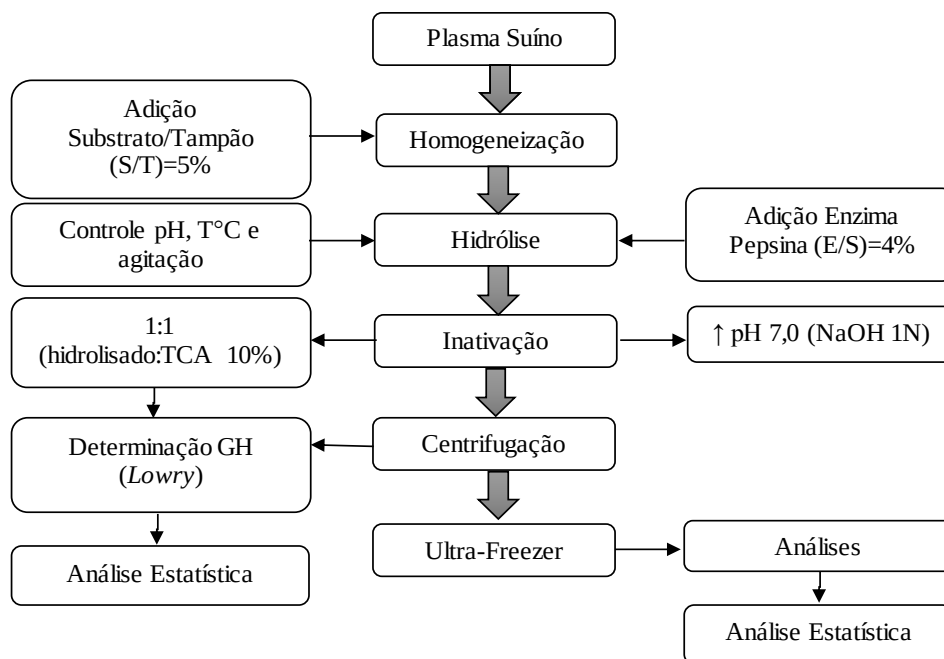
Onde, x_i , x_j , x_k são as variáveis independentes (temperatura, pH e agitação) que afetam a resposta prevista y (neste caso o GH) e β_0 , β_i , β_{ii} , β_{ij} são os coeficientes de intercepto, linear, quadrático e termos de interação. Os coeficientes da função resposta e sua significância estatística foram avaliados pela análise de regressão da superfície de resposta. O teste de Fisher (valor F) foi utilizado para determinar se o modelo de segunda ordem era adequado para descrever os dados obtidos, enquanto a adequação do modelo foi avaliada pelo coeficiente de determinação (R^2).

Após a otimização das condições de hidrólise, repetiu-se a reação na condição otimizada e obteve-se hidrolisados dos tempos 0 min, 15 min, 30 min, 60 min 90 min e 120 min de processo. Estes hidrolisados foram utilizados para a determinação das bioatividades.

5.2.5 Obtenção dos hidrolisados proteicos de plasma suíno

O processo de obtenção dos hidrolisados proteicos de plasma utilizando a Pepsina, tanto na etapa de otimização como na sequência do estudo, seguiu as etapas mostradas na Figura 12.

Figura 12 - Fluxograma da obtenção do hidrolisado proteico de plasma suíno utilizando a enzima Pepsina.



Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

Os ensaios de hidrólise foram conduzidos em frascos Erlenmeyers, nos quais o plasma suíno foi suspenso em tampão KCl-HCl (0,2 M) na proporção substrato/tampão (S/T) de 5% em relação ao teor de proteína do plasma. O pH da suspensão foi ajustado com NaOH 1N e/ou HCl 1N, sendo então adicionada a enzima na proporção (E/S) de 4%. A mistura foi exposta ao tratamento em banho de agitação orbital seguindo as condições definidas pelo DCCR.

Alíquotas dos hidrolisados foram coletados nos tempos 0 min, 15 min, 30 min, 60 min, 90 min e 120 min, seguido da inativação enzimática realizada com ácido tricloroacético (TCA) 20% para concentração final de 10% (1:1) para medida do grau de hidrólise e pelo aumento do pH para 7,0 com NaOH 1N para a produção do hidrolisado proteico final. A mistura reacional do hidrolisado obtido por inativação térmica foi centrifugado 10.000 xg durante 15 min a 4°C para a remoção do material insolúvel precipitado pelo TCA, e imediatamente coletado e congelado em ultra-freezer para posterior determinação das demais análises (HOYLE; MERRITT, 1994). As proteínas solúveis foram quantificadas pelo método de Lowry et al. (1951), no qual a concentração de proteína foi calculada utilizando a curva padrão de albumina bovina, obtida utilizando concentrações de albumina bovina de 0,01 a 0,73 mg.mL⁻¹. As leituras das amostras

foram realizadas em espectrofotômetro a 660 nm. O GH foi expresso como percentagem de proteínas solúveis no TCA em relação à quantidade de proteína inicial total, e calculado em mg.mL^{-1} , utilizando-se a Equação 10.

$$GH = \frac{\text{Proteína Solúvel em TCA (10\%)}}{\text{Proteína Total da Amostra}} \times 100 \quad (10)$$

5.2.6 Determinação da proteína solúvel em TCA dos hidrolisados de plasma suíno

A determinação da proteína solúvel dos hidrolisados de plasma suíno, cujo resultado é utilizado para o cálculo do GH, foi realizada empregando a metodologia de Lowry, de acordo com Macedo et al. (2005). Em tubos de ensaio contendo 500 μL dos hidrolisados, foi adicionado 500 μL do reagente A (2 g $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 100 g de Na_2CO_3 em 500 mL de uma solução NaOH 1N e completado o volume de 1000 mL com água destilada), em seguida a mistura foi agitada e incubada em banho-maria a 50 °C por 10 min. Passando o tempo de tratamento térmico, os tubos foram resfriados em água corrente e adicionado 50 μL do reagente B (5 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 10 g $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ em 50 mL de NaOH 1N e completado o volume para 500 mL com água destilada), sendo a mistura agitada e em seguida deixada em repouso por mais 10 min. Posteriormente, foi adicionado 1500 μL de reagente de *Folin Ciocalteu* 1:15 (reagente C) sendo a mistura agitada e incubada a 50 °C por 10 min. Transcorrido o tempo, os tubos foram resfriados e as amostras foram lidas em espectrofotômetro a 660 nm. As amostras foram lidas contra um branco (500 μL de água destilada e 2000 μL de reagente A).

5.2.7 Determinação dos parâmetros cinéticos da protease (K_m e $v_{m\acute{a}x}$)

As constantes cinéticas, K_m e $v_{m\acute{a}x}$, da enzima Pepsina foram determinadas utilizando diferentes concentrações de substrato (1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9% e 10%, m.v^{-1}). A relação S/T e as demais variáveis seguiram as condições otimizadas do planejamento. Para todos os ensaios, o GH foi determinado após 120 min de reação. Os valores aparentes de K_m e $v_{m\acute{a}x}$ foram calculados a partir da equação de Michaelis-Menten (Equação 11), linearizada utilizando o método de Lineweaver-Burk, obtendo-se um gráfico de $1/v_0$ versus $1/S$, onde $[S]$ é a concentração do substrato, v e $v_{m\acute{a}x}$ representam a taxa inicial e máxima de reação, respectivamente, e K_m é a constante de Michaelis-Menten.

$$v = \frac{v_{m\acute{a}x} \times S}{S + K_m} \quad (11)$$

5.2.8 Análise da cor instrumental dos hidrolisados proteicos de plasma suíno

A determinação da cor dos hidrolisados foi realizada através do sistema CIE, através dos parâmetros de medida L^* (luminosidade), a^* (vermelho, + ou verde, -) e b^* (amarelo, + ou azul, -) e b^* ($-60 = \text{azul}$, $+60 = \text{amarelo}$). A cor foi avaliada como ângulo de matiz ($h = \tan^{-1} [b^*/a^*]$), que corresponde ao tom da cor e está associado à cor percebida pelo olho humano, onde $0^\circ = \text{vermelho}$, $90^\circ = \text{amarelo}$, $180^\circ = \text{verde}$ e $270^\circ = \text{azul}$ e croma ($C = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2}$), ou saturação de cor, uma medida da vivacidade da cor (valores mais altos indicam uma cor mais vívida) (ANSORENA et al., 1997).

5.2.9 Tamanho das frações peptídicas através da eletroforese SDS-PAGE

Os hidrolisados de plasma suíno obtidos em diferentes intervalos de tempo de hidrólise com Pepsina, foram aplicados em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 15% (m.v⁻¹). Os peptídeos foram diluídos em tampão de amostra (glicerol 100%, SDS 10%, Tampão Tris 0,5 M pH 6,8 e azul de bromofenol 0,5%) e aquecidas a 95°C por 5 min. A corrida de eletroforese foi realizada ajustando-se a potência para 60 V até as amostras ultrapassarem o gel de empilhamento e então ajustou-se para 120 V até o final da corrida. Em seguida, as bandas de proteínas foram coradas com azul brilhante de *Coomassie*, descoradas em solução descorante (metanol 25%, ácido acético 10% e água destilada 65%) e visualizadas sob luz UV em transiluminador (LAEMMLI, 1970).

5.2.10 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) dos hidrolisados de plasma suíno

As amostras dos hidrolisados foram devidamente dispersas em pastilhas de KBr. Os espectros de FT-IR ($4.000 - 400\text{ cm}^{-1}$) dos hidrolisados foram produzidos a uma resolução de 4 cm^{-1} a qual foram realizados 64 varreduras e determinadas as transmitâncias (WOJEICCHOWSKI et al., 2018).

5.2.11 Atividade antimicrobiana

Cinco cepas microbianas, três bactérias Gram positivas (G^+) (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* CCCD B001 e *Listeria monocytogenes* Scott A) e duas bactérias Gram negativas (G^-) (*Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 e *Escherichia coli* ATCC 25922) foram usadas como indicadores para avaliar a atividade antimicrobiana. As culturas indicadoras foram repicadas em 9 mL de caldo BHI e incubadas em *overnight* à 37°C . Após incubação, as culturas foram diluídas para 10^6 UFC.ml^{-1} . A atividade antimicrobiana dos

hidrolisados de plasma suíno, foram avaliadas pelo ensaio de difusão em disco conforme descrito Bauer et al. (1966). Os peptídeos testados foram filtrados através de um filtro de membrana de acetato de celulose com tamanho de poro de 0,45 µm (Sartorius Stedim Biotech S.A., Alemanha). Discos de papel estéreis (com diâmetro de 5 mm) foram saturados com 15 µL de amostras, e colocados na superfície das placas de ágar TSA (Tryptona de Soja), previamente semeadas com 100 µL da cepa indicadora. As placas foram então incubadas a 37°C durante 24 h e subsequentemente examinadas quanto à presença de zonas de inibição indicativas de atividade antimicrobiana. A atividade antimicrobiana foi comparada com controles positivos: Penicilina (10 µg), Ampicilina (10 µg) e Tetraciclina (30 µg).

5.2.12 Atividade antioxidante

5.2.12.1 Atividade de eliminação de radicais DPPH

O ensaio da atividade de eliminação de radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) foi determinada de acordo com Najafian e Babji (2014) com modificações. 1 mL de cada amostra (0,1; 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4; e 5 mg.mL⁻¹) foram misturados com 1 mL de 0,15 mM de DPPH em etanol a 95%. Após mistura vigorosa, a solução foi incubada durante 30 min à temperatura ambiente no escuro. A leitura de absorbância foi realizada a 517 nm. Uma solução de controle, utilizando água destilada em vez da amostra, foi preparada da mesma maneira. O efeito de eliminação foi quantificado de acordo com a Equação 12:

$$DPPH \text{ (\%)} = \left[\frac{(A_{controle} - A_{amostra})}{A_{controle}} \right] \times 100 \quad (12)$$

Onde $A_{controle}$ representa a absorbância do controle e $A_{amostra}$ representa a absorbância da amostra. A concentração de eliminação (EC_{50}) foi definida como a quantidade de hidrolisado necessária para redução de 50% da atividade de eliminação do radical livre. Os valores de EC_{50} foram obtidos a partir das curvas de inibição resultantes.

5.2.12.2 Poder antioxidante redutor de ferro

O poder antioxidante redutor de ferro foi determinado seguindo o método de Wu; Chen; Shiau (2003). Foram adicionados 2 mL de amostra (1, 2, 3, 4 e 5 mg.mL⁻¹) e 2 mL de ferricianeto de potássio (1%) a 2 mL de tampão fosfato 0,2 M (pH 6,6) e a mistura foi incubada a 50 °C durante 20 min. Em seguida, 2 mL de TCA 10% foram adicionados e centrifugados durante 10 min a 1210xg. À camada superior (2 mL) de cada amostra, foram adicionados 2 mL de água destilada e 0,4 mL de cloreto férrico (0,1%). A reação foi deixada

em repouso durante 10 min e a absorbância da solução foi medida a 700 nm. O controle foi preparado usando água destilada em vez da amostra. O aumento da absorbância a 700 nm indica um aumento do poder de redução dos hidrolisados.

5.2.13 Ensaio de inibição da α -amilase e da α -glucosidase (atividade antidiabética)

Um ensaio inibidor de α -amilase foi realizado de acordo com o método de Bernfeld, 1951; Oboh; Ademiluyi; Faloye (2011). Em tubos de ensaio adicionou-se 125 μ l de hidrolisado (0,5 a 2,0 mg.mL⁻¹) e 125 μ l da solução de α -amilase (0,5 mg.mL⁻¹) preparada em tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 6,9). O conteúdo de cada tubo foi pré-incubado a 25 °C por 10 min. Após, foram adicionados 125 μ L de solução de amido a 1% em tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 6,9) e as misturas reacionais foram incubadas a 25 °C durante 10 min. A reação foi interrompida pela adição de 250 μ l do reagente corante DNS e, posteriormente, incubada em água fervente por 5 min e resfriada à temperatura ambiente. O conteúdo de cada tubo de ensaio foi diluído com 2,5 mL de água destilada e a absorbância medida a 540 nm. Um controle foi preparado usando o mesmo procedimento, exceto que o hidrolisado foi substituído por tampão fosfato de sódio. A atividade inibidora da α -amilase foi calculada como mostrado na Equação 13:

$$\% \text{ inibição} = \left[\frac{(A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}})}{A_{\text{controle}}} \right] \times 100 \quad (13)$$

Onde A_{controle} representa a absorbância do controle e A_{amostra} representa a absorbância da amostra.

A atividade inibitória da α -glucosidase foi determinada de acordo com o método descrito por Apostolidis; Kwon; Shetty (2007). Foram misturados 50 μ L dos hidrolisados em diferentes concentrações (0,1 a 2,0 mg.mL⁻¹) com 100 μ L de enzima (1 U.mL⁻¹ em tampão fosfato de sódio a 0,1 M pH 6,9) e incubados durante 10 min, a 25 °C. Posteriormente, foram adicionados 50 μ L de pNPG (5 mM) e as amostras foram incubadas durante 5 min a 25 °C. A absorbância foi lida a 405 nm em leitor de microplacas. O controle continha 50 μ l de solução tampão no lugar do hidrolisado. A atividade inibidora da α -glucosidase foi expressa como (%) de inibição e foi calculada como mostrado na Equação 14:

$$\% \text{ inibição} = \left[\frac{(A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}})}{A_{\text{controle}}} \right] \times 100 \quad (14)$$

Onde A_{controle} representa a absorbância do controle e A_{amostra} representa a absorbância da amostra.

5.2.14 Atividade inibitória da enzima conversora da angiotensina-I (ECA) (atividade anti-hipertensiva)

A atividade inibitória da ECA dos hidrolisados foi realizada de acordo com método descrito por (ELAVARASAN; SHAMASUNDAR, 2014; RAGHAVAN; KRISTINSSON, 2009). Foram misturados o hidrolisado (200 µl de uma solução 2,0 mg.mL⁻¹ de concentração proteica), a enzima ECA (100 µl de uma solução 50 mU de enzima) dissolvida em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) contendo NaCl 0,3 M e o substrato FAPGG (2 mL de uma solução 0,5 mM) dissolvido em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) contendo NaCl 0,3 M. A hidrólise de FAPGG por ECA resulta numa diminuição da absorbância a 340 nm e esta foi monitorada durante 30 min a 25 °C. Uma amostra contendo FAPGG e ECA foi utilizada como controle. Maleato de enalapril, um inibidor sintético, foi usado como padrão para comparar a atividade inibitória da ECA na concentração de 10⁻³ M. A inibição da ECA foi calculada de acordo com a Equação 15:

$$\% \text{ inibição da ECA} = \left[\frac{(A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}})}{A_{\text{controle}}} \right] \times 100 \quad (15)$$

Onde A_{amostra} é a absorbância da mistura de enzima, hidrolisado e substrato e A_{controle} é a absorbância da mistura enzima e substrato (sem hidrolisado).

5.2.15 Análise estatística

Todos os ensaios foram realizados em triplicata e a significância estatística entre os níveis foi avaliada usando análise de variância (ANOVA) e a diferença entre as médias foi avaliada utilizando o teste de Tukey ($p < 0,05$). O software *Statistica*® 13.3 foi utilizado para a geração e avaliação do planejamento experimental estatístico.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Caracterização físico-química do plasma suíno

A caracterização do plasma suíno está apresentada na Tabela 14, cujos resultados são expressos sobre a base seca, na forma de média da triplicata $\pm$ desvio padrão. Deve-se notar que o conteúdo de proteína bruta no plasma foi de 82,44%. Os resultados indicam que o aproveitamento dessa matéria-prima pode ser destinado a produção de hidrolisados de proteína, através do qual este constituinte, nutricionalmente importante, pode ser recuperado.

Niu et al. (2018) utilizaram plasma suíno contendo 85% de proteína, adquirido da Beidahuang Meat Corporation (Harbin, Heilongjiang, China), com valor próximo ao

encontrado neste estudo, para proteína. Pérez-Gálvez et al. (2011) realizaram estudo de hidrólise enzimática empregando farinha de sangue suína (Protesan, APC, Barcelona, Espanha), obtida de sangue de porco por coagulação e secagem, contendo 89% em proteína, 1,5% em gordura e 1,2% em cinzas. Desta forma, fica evidenciado o alto teor de proteína deste subproduto.

Tabela 14 - Caracterização do plasma suíno utilizado para a preparação dos hidrolisados.

Parâmetro (%)	Plasma
Umidade	5,06 ± 0,13
Proteína	82,44 ± 0,25
Lipídios	0,59 ± 0,30
Cinzas	7,42 ± 0,07
Carboidratos	4,49 ± 0,15

Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

5.3.2 Otimização das condições experimentais para a obtenção dos hidrolisados de plasma suíno

Na Tabela 15 estão mostrados os resultados do GH para os experimentos do Delineamento Composto Central Rotacional, utilizando plasma suíno e Pepsina.

O GH apresentou uma variação de 17,25 a 28,44%, sendo o maior valor do GH representado pelo E10, equivalente a temperatura, pH e agitação de 42 °C, pH 2 e 125 rpm, respectivamente, e o menor GH em 34 °C, pH 2,5 e 150 rpm, equivalente ao E4. A variabilidade dos pontos centrais (experimentos 15, 16 e 17) indicou boa reprodutibilidade dos dados experimentais.

Tabela 15 - Resultados do grau de hidrólise do plasma suíno com Pepsina para os experimentos do Delineamento Composto Central Rotacional com pontos axiais utilizado na otimização das variáveis através da metodologia de superfície de resposta (MSR).

Variáveis independentes				Variável de Resposta
Experimento	Temperatura (°C) (x_1)	pH (x_2)	Agitação (rpm) (x_3)	GH (%)
E1	-1,0 (34)	-1,0 (1,5)	-1,0 (100)	21,25
E2	-1,0 (34)	-1,0 (1,5)	1,0 (150)	19,49
E3	-1,0 (34)	1,0 (2,5)	-1,0 (100)	17,66
E4	-1,0 (34)	1,0 (2,5)	1,0 (150)	17,25
E5	1,0 (40)	-1,0 (1,5)	-1,0 (100)	24,88
E6	1,0 (40)	-1,0 (1,5)	1,0 (150)	24,73
E7	1,0 (40)	1,0 (2,5)	-1,0 (100)	20,81
E8	1,0 (40)	1,0 (2,5)	1,0 (150)	25,49
E9	-1,68 (32)	0,0 (2,0)	0,0 (125)	21,58
E10	1,68 (42)	0,0 (2,0)	0,0 (125)	28,44
E11	0,0 (37)	-1,68 (1,2)	0,0 (125)	27,88

E12	0,0 (37)	1,68 (2,8)	0,0 (125)	20,66
E13	0,0 (37)	0,0 (2,0)	-1,68 (83)	23,97
E14	0,0 (37)	0,0 (2,0)	1,68 (167)	24,75
E15 (C)*	0,0 (37)	0,0 (2,0)	0,0 (125)	26,23
E16 (C)*	0,0 (37)	0,0 (2,0)	0,0 (125)	26,26
E17 (C)*	0,0 (37)	0,0 (2,0)	0,0 (125)	26,69

*(C) ponto central do planejamento experimental.

Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

Analisando-se os termos na Tabela 16, observou-se que apenas os parâmetros de agitação (L) e a interação temperatura X pH não foram significativos em $p > 0,05$, sendo que o fator temperatura (L) foi o que apresentou maior efeito sobre a resposta analisada.

Tabela 16 - Estimativas dos coeficientes obtidos a partir do modelo de regressão no DCCR para a temperatura, pH e agitação no processo de hidrólise enzimática do plasma com Pepsina.

Fator	Coefficiente de regressão	Erro padrão	t-value	p-value
Intercessão	26,5860	0,1483	179,2777	0,0000
Temperatura (L)*	4,6566	0,1393	33,4329	0,0009
Temperatura (Q)*	-2,3056	0,1533	-15,0398	0,0044
pH (L)*	-3,1168	0,1393	-22,3774	0,0020
pH (Q)*	-2,8289	0,1533	-18,4531	0,0029
Agitação (L)	0,5377	0,1393	3,8607	0,0610
Agitação (Q)*	-2,7652	0,1533	-18,0380	0,0031
Temperatura X pH	0,6300	0,1820	3,4619	0,0743
Temperatura X Agitação	1,6750	0,1820	9,2043	0,0116
pH X Agitação	1,5450	0,1820	8,4900	0,0136

*Fator de significância ($p < 0,05$) (L):linear (Q): quadrático

Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

A análise de variância (ANOVA) apresentada na Tabela 17 mostrou que 82,06% da variação total foi explicada pelo modelo. Os resultados também demonstram que o modelo não é significativo nos intervalos dos pontos estudados, já que o valor F calculado, 2,53 para a regressão, foi menor do que o valor F tabelado (3,68) com intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$).

Tabela 17 – ANOVA para o modelo polinomial de segunda ordem referente ao grau de hidrólise do plasma obtido com o uso da Pepsina.

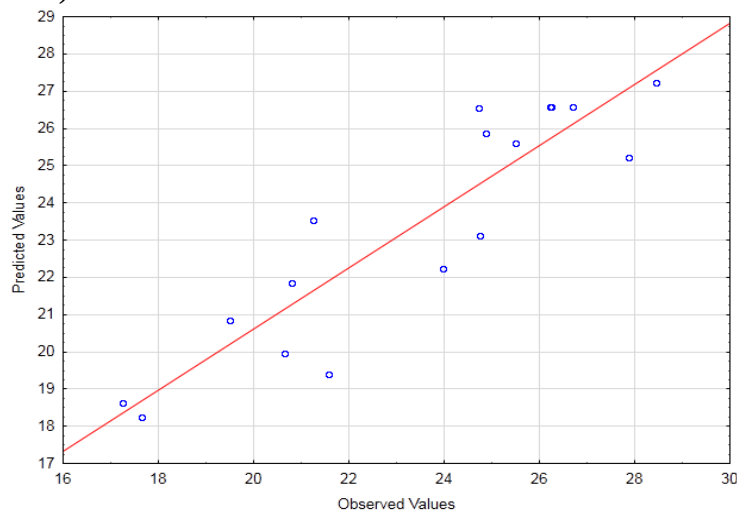
Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	F calculado
Regressão	156,8703	9	17,4300	2,53
Falta de Ajuste	34,1626	5	6,83251	
Erro puro	0,1325	2	0,06623	
Total	191,1654	16		

$F_{0,05;9,7}$ (F tabelado) = 3,68 $R^2 = 0,8206$

Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

A Figura 13 compara os valores previstos com os dados observados para a variável de resposta, evidenciando uma correlação confiável com o coeficiente de determinação $R^2=0,8206$.

Figura 13 - Comparação entre o valor experimental (observado) e calculado da variável de resposta (GH) (predito).



Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

Desta forma, a análise foi refeita ignorando as relações não significativas, resultando em outro teste de significância com acréscimo de graus de liberdade. Os resultados foram apresentados na Tabela 18.

Tabela 18 – Teste de Significância ANOVA, somente com as variáveis significativas.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	F calculado
Regressão	155,0893	7	22,1556	4,26
Falta de Ajuste	35,9436	7	5,13480	
Erro puro	0,1325	2	0,06623	
Total	191,1654	16		
$F_{0.05;7,9}$ (F tabelado) = 3,29 $R^2 = 0,8113$				

Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

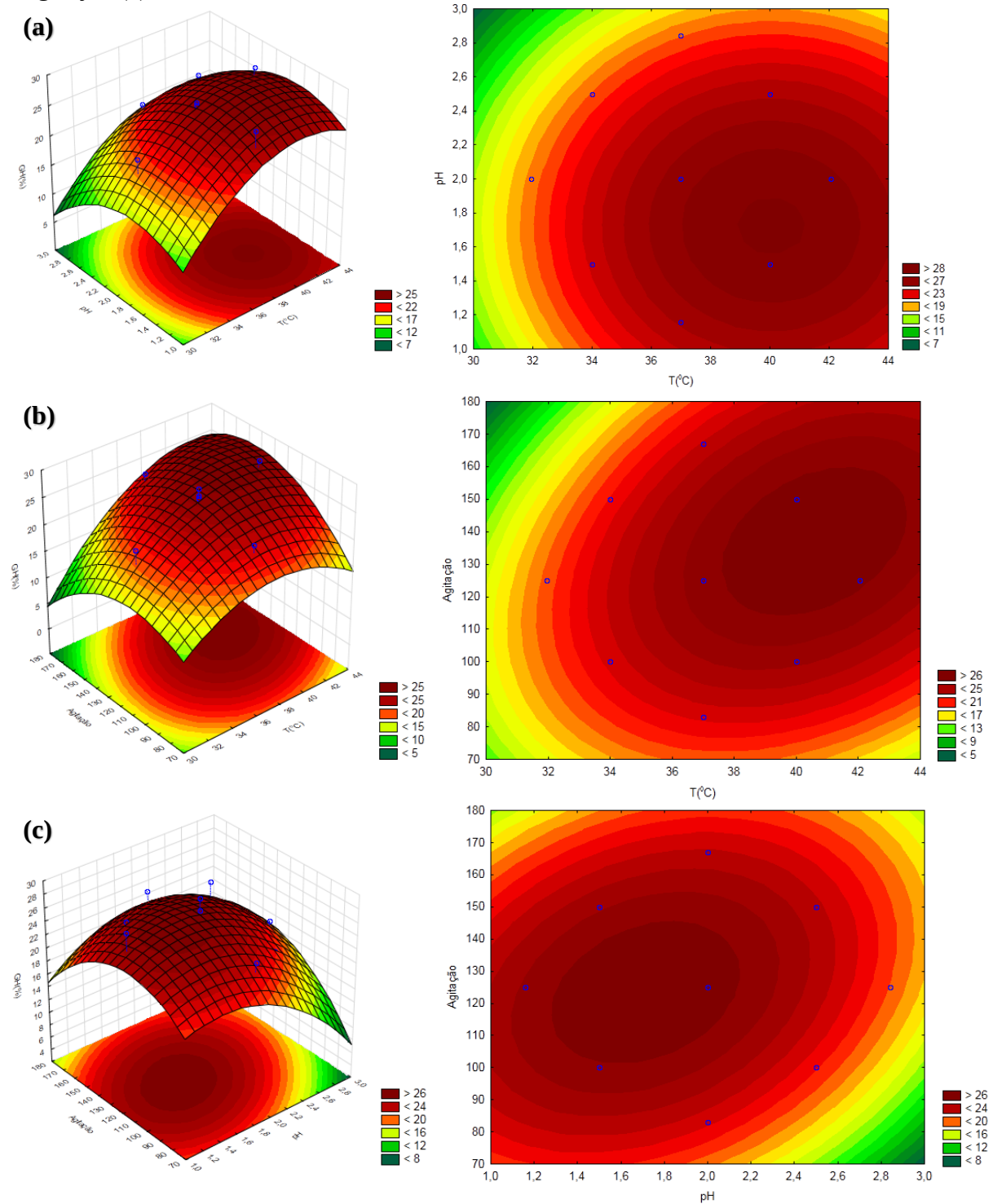
Após análise refeita e através dos coeficientes de regressão, é possível chegar ao seguinte modelo matemático para equação de determinação de grau de hidrólise de acordo com os fatores de entrada temperatura (x_1), pH (x_2), e agitação (x_3).

$$GH(\%) = 26,5860 + 4,6566 x_1 - 2,3056 x_1^2 - 3,1168 x_2 - 2,8289 x_2^2 - 2,7652 x_3^2 + 1,6750 x_1 x_3 + 1,5450 x_2 x_3 \quad (16)$$

Com base nos dados e na equação gerada para as variáveis temperatura, pH e agitação, sobre o GH do plasma suíno utilizando Pepsina e eliminando as variáveis não significativas, foram construídas as superfícies de resposta e as curvas de contorno como demonstrado na

Figura 14a, b, c. A região vermelha indica a faixa ótima de trabalho para a temperatura entre os níveis 37 °C e 42 °C, o pH entre 1,5 e 2,0 e a agitação entre 125 e 150 rpm.

Figura 14 - Superfícies de Resposta e Curvas de Contorno referentes ao grau de hidrólise do plasma suíno com pepsina em função da temperatura e pH (a) temperatura e agitação (b) e pH e agitação (c).

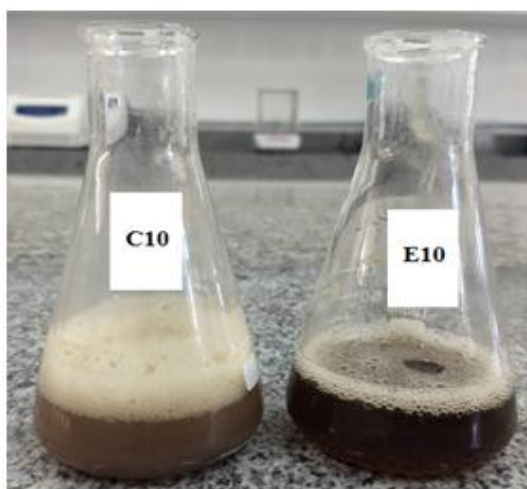


Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

Sun et al. (2011) investigaram os efeitos das condições de hidrólise (temperatura, pH e relação E/S) de hemoglobina suína e como biocatalisador a Pepsina, através de um planejamento experimental com 23 ensaios (9 pontos centrais). Os intervalos dos parâmetros utilizados foram de 32 °C a 42 °C para a temperatura, de 1,3 a 2,7 para o pH e de 0,7 a 2,1% m/m para a razão E/S. O teor de proteína bruta da hemoglobina suína utilizada foi de 92%. O estudo indicou uma taxa de hidrólise de 7,6% aos 60 min nas condições ótimas de 40,4 °C; pH 1,6 e relação E/S 1,6%. Através desse estudo é possível observar que todas as variáveis empregadas em um estudo de hidrólise enzimática influenciam diretamente no grau de hidrólise, pois dependem tanto da matéria-prima empregada como das condições utilizadas, para uma maior eficiência da enzima.

Verificou-se nas superfícies de resposta que a região de maximização do grau de hidrólise encontra-se nos níveis (+1,68; 0; 0), correspondendo à 42 °C para a temperatura, 2,0 para o pH e 125 rpm para agitação, referente ao ensaio demonstrado na Figura 15 que representa o ensaio após 120 min, realizado nessas condições.

Figura 15 – Aspecto visual do experimento C10 (amostra sem enzima após 120 min submetida as mesmas condições de hidrólise) e do experimento E10 (amostra com enzima após 120 min de hidrólise).



Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

Pela determinação dos valores críticos de temperatura, pH e agitação obteve-se as medidas do GH do plasma suíno utilizando a enzima pepsina para validação do modelo estatístico. O valor de GH obtido pelo procedimento de validação experimental foi de 28,44%, valor muito próximo ao predito pelo modelo matemático nas condições otimizadas (28,16%), apresentando erro relativo de apenas 0,98%. A forte correlação entre os resultados real e predito confirmou que o modelo matemático obtido foi capaz de refletir satisfatoriamente o GH, tornando-o adequado para prever os efeitos que a modificação dos níveis de cada variável em

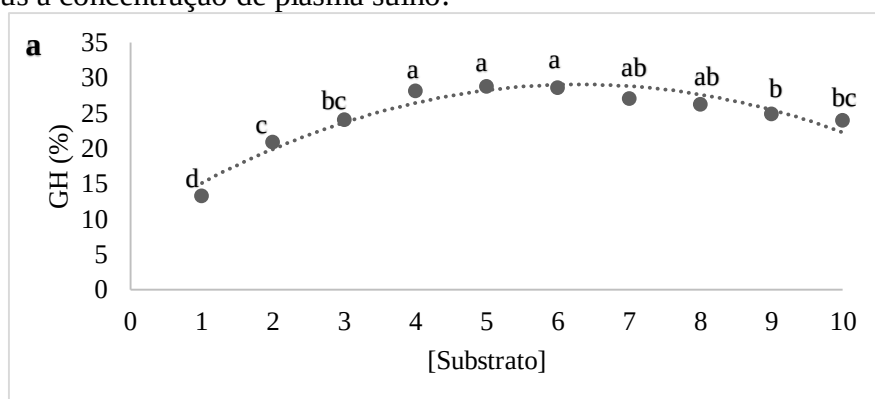
questão pode provocar na variável resposta (se a modificação dos níveis provoca aumento ou diminuição da resposta analisada).

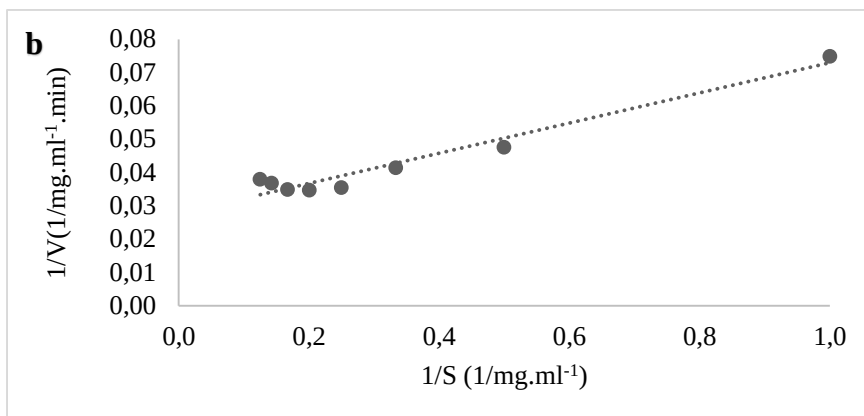
5.3.3 Determinação dos parâmetros cinéticos da protease (K_m e $v_{m\acute{a}x}$)

Na Figura 16a verificou-se que não houve aumento considerável no grau de hidrólise após a concentração de 4% de substrato, mostrando que as concentrações 4%, 5%, 6%, 7% e 8% de substrato não diferiram estatisticamente entre si ($p < 0,05$). Nesta fase da curva, a reação deixa de comportar-se como uma reação de primeira ordem e passa a ser uma reação de ordem zero, onde o aumento da concentração de substrato não afeta a velocidade da reação. A partir da concentração de 9%, verificou-se um declínio na curva, com diminuição da velocidade de reação, explicado pela possível inibição da enzima pelo excesso de substrato ou produto proteico clivado ou pela redução de locais de hidrólise disponíveis (NCHIENZIA; MORAWICKI; GADANG, 2010). Notou-se que os tratamentos com concentrações acima de 6% aumentaram a viscosidade da solução, assim como formaram gel após o resfriamento.

Traçando os resultados do GH de acordo com o gráfico dos recíprocos de Lineweaver-Burk (Figura 16a), para as concentrações de substrato até 8% (onde o modelo comportou-se de acordo com a cinética de Michaelis-Menten), observou-se boa correlação com a cinética de Michaelis-Menten ($R^2 = 0,964$). Esses parâmetros sugerem que menor valor de K_m indica maior afinidade pelo substrato, enquanto maior valor de $v_{m\acute{a}x}$ indica melhor cinética de reação (SOUZA et al., 2015).

Figura 16 - Gráfico de duplo recíproco (Lineweaver-Burk) do grau de hidrólise (%) pela enzima Pepsina versus a concentração de plasma suíno.





Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

O valor de K_m , $v_{m\acute{a}x}$ e o coeficiente de correlação linear obtido pela linearização de Lineweaver–Burk está apresentado na Tabela 19.

Os valores dos parâmetros cinéticos obtidos para hidrólise enzimática da celulose de bagaço de cana-de-açúcar utilizando enzima Accelerase® 1500 foi de $K_M = 39,78 \text{ g.L}^{-1}$ e $v_{m\acute{a}x} = 0,105 \text{ g.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$ (CARVALHO, 2011). Brito, (2017) realizou a caracterização cinética para produção de amilases, na qual o extrato utilizado para hidrólise foi amido da mandioca (*Manihot esculenta*). Os valores encontrados de K_M e $V_{m\acute{a}x}$ foram de $37,2 \text{ mg.mL}^{-1}$ e $4,0 \text{ mg.mL}^{-1}.\text{min}^{-1}$, respectivamente. Os resultados obtidos no presente estudo se assemelham aos resultados apresentados pelos demais autores citados, demonstrando que os parâmetros cinéticos para as reações enzimáticas conduzidas utilizando diferentes substratos apresentaram dados experimentais próximos.

Tabela 19 - Parâmetros cinéticos K_m , $v_{m\acute{a}x}$ da Pepsina utilizando o plasma suíno como substrato e coeficiente de correlação linear obtido pela linearização de Lineweaver–Burk.

Hidrólise	Parâmetro	Lineweaver–Burk
Pepsina	$k_m \text{ (mg.mL}^{-1}\text{)}$	1,6
	$v_{m\acute{a}x} \text{ (mg.mL}^{-1}.\text{min)}$	36,2
	R^2	0,964
Hidrólise nas condições ótimas de pH, temperatura e agitação determinadas com DCCR com 120 min de reação		

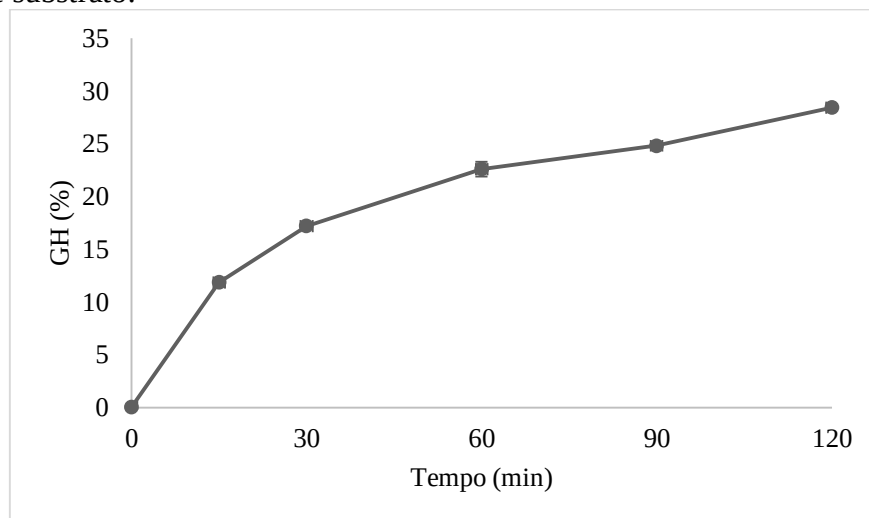
Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

5.3.4 Determinação do grau de hidrólise do plasma suíno ao longo do tempo

O plasma suíno foi hidrolisado com Pepsina nas respectivas condições ótimas nos tempos 0 min, 15 min, 30 min, 60 min, 90 min e 120 min e monitorado através do GH que descreve a reação proteolítica e indica a capacidade de uma protease degradar o substrato proteico. A Figura 17 mostra a relação entre o GH e o tempo de reação, na qual após 120 min

de hidrólise, o plasma suíno apresentou o maior GH (28,44%) diferindo estatisticamente dos demais tempos analisados ($p < 0,05$).

Figura 17 - Curva cinética de hidrólise do plasma suíno com Pepsina, em 42 °C, pH 2,0, 125 rpm e 4% de substrato.



Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

A Pepsina, na condição de 37 °C, pH 2,0, E/S 1,6%, foi utilizada para hidrolisar hemoglobina suína (SUN; SHEN; LUO, 2011). O GH obtido aumentou com o decorrer do tempo de hidrólise, o qual prosseguiu a uma taxa alta durante os 60 min iniciais equivalendo a 7,7%, valor inferior ao encontrado no mesmo tempo de hidrólise utilizando plasma suíno, mostrando que a matéria-prima utilizada e as condições de hidrólise interferem diretamente na clivagem dos peptídeos.

5.3.5 Análise da cor instrumental dos hidrolisados proteicos de plasma suíno

A cor dos hidrolisados de plasma suíno, obtidos em diferentes tempos e utilizando a Pepsina, expressos em termos de L*, a*, b*, C* e h, está apresentada na Tabela 20.

Tabela 20 - Cor instrumental dos hidrolisados de plasma suíno obtidos com uso de Pepsina e em diferentes tempos.

Tempo (min)	L*	a*	b*	C*	h
0	35,54 ± 0,20 ^a	2,71 ± 0,05 ^d	14,98 ± 0,08 ^c	15,22 ± 0,07 ^c	1,39 < 0,01 ^a
15	34,62 ± 0,08 ^b	3,92 ± 0,23 ^c	15,01 ± 0,27 ^c	15,51 ± 0,20 ^c	1,32 ± 0,02 ^b
30	32,86 ± 0,12 ^d	5,72 ± 0,26 ^a	16,29 ± 0,04 ^{ab}	17,26 ± 0,13 ^a	1,23 ± 0,01 ^c
60	33,71 ± 0,13 ^c	4,87 ± 0,17 ^b	16,63 ± 0,10 ^a	17,33 ± 0,05 ^a	1,29 ± 0,01 ^b
90	33,41 ± 0,06 ^c	4,82 ± 0,15 ^b	16,56 ± 0,06 ^a	17,24 ± 0,10 ^a	1,29 ± 0,01 ^b
120	32,15 ± 0,11 ^e	5,50 ± 0,19 ^{ab}	15,85 ± 0,02 ^b	16,77 ± 0,04 ^b	1,24 ± 0,01 ^c

*Médias seguidas por letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

A maior luminosidade foi medida na amostra sem hidrólise ocorrendo uma mudança nesse parâmetro com o decorrer do tempo, na qual a amostra com maior luminosidade foi no hidrolisado de 120 min, diferindo-se estatisticamente dos demais tempos ($p < 0,05$). Os hidrolisados de 30 min, 60 min, 90 min e 120 min apresentam as medidas de maior vermelhidão assim como os hidrolisados de 30 min, 60 min e 90 min, que apresentaram as medidas de maior amarelecimento, não diferindo estatisticamente entre si ao nível de 5% de significância. O croma, que é uma medida da cor total, mostrou que os hidrolisados de 30 min, 60 min e 90 min, apresentaram cores mais vívidas.

As alterações parecem indicar que a cor do hidrolisado de proteína de plasma suíno é influenciada pelo tratamento enzimático com Pepsina. Segundo Bueno-Solano et al. (2009), a hidrólise de proteínas produz peptídeos com cor acastanhada que podem gerar uma alteração de cor nos produtos nos quais estes hidrolisados são acrescentados.

5.3.6 Tamanho das frações peptídicas através da eletroforese SDS-PAGE

A análise de SDS-PAGE do hidrolisado de proteína de plasma suíno é mostrada na Figura 18. A amostra sem hidrólise (Figura 18a) apresenta um número de bandas de alta massa molecular e mais uma banda de menor massa molecular entre 15 e 10 kDa, possuindo massas próximas aos padrões mais utilizados (lisozima de clara de ovo 14,3 kDa; α -lactalbumina de leite bovino 14,2 kDa). As bandas de alta massa molecular foram digeridas em fragmentos de menor massa no decorrer do tempo de hidrólise, se concentrando na região de 10 kDa.

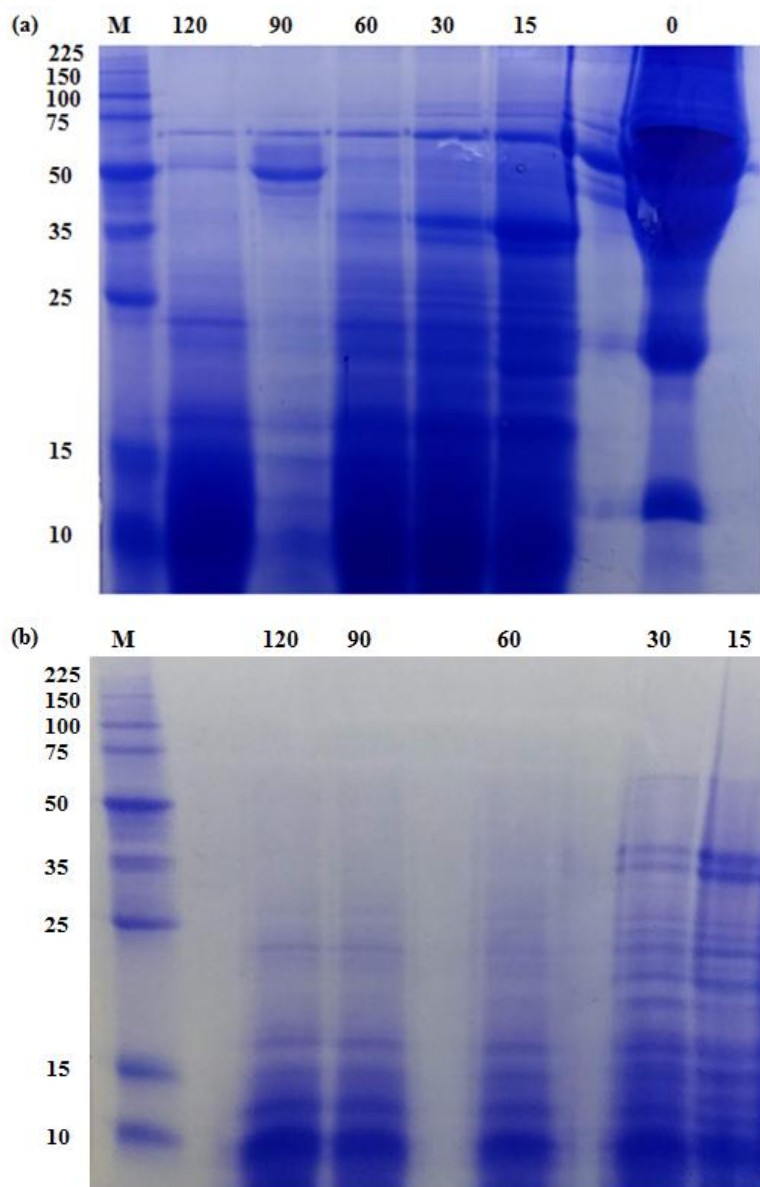
Os hidrolisados ainda foram testados a 5 mg.mL^{-1} (Figura 18b), para melhor visualização e separação das bandas. A análise mostrou um número de bandas de baixa massa molecular (em torno de 10 kDa) próximas ao fundo do gel. Isto demonstra que a Pepsina pode facilmente hidrolisar proteínas de plasma em grandes quantidades gerando peptídeos de baixa massa molecular.

A massa molecular de hemoglobina suína e seu hidrolisado preparado com Pepsina foram determinados por Sun; Luo (2011). Hemoglobina sem hidrólise apresentou três bandas, correspondendo a três formas de globina: tetra-, di- e monomérica (67 kDa, 37 kDa e 16 kDa, respectivamente). Já a massa molecular dos peptídeos obtidos foi menor que 2 kDa.

É relatado que peptídeos de baixa massa molecular possuem alto valor nutritivo e também podem ser absorvidos efetivamente pelo organismo. Além disso, os hidrolisados são capazes de atravessar a barreira epitelial digestiva e atingir os vasos sanguíneos, o que lhes permite ocasionar efeitos benéficos para o organismo (CHALAMAIAH; YU; WU, 2018; LICEAGA; HALL, 2018; TOLDRÃ; MORA; REIG, 2016).

Xu; Cao; Yang (2009) hidrolisaram plasma suíno através do tratamento enzimático com Pepsina durante 5 h. Peptídeos de massas moleculares altas (>26,6 kDa) foram relativamente suscetíveis à hidrólise com a Pepsina, sendo completamente degradados na primeira hora de hidrólise. Bandas com mais de 17 kDa não eram mais visíveis no gel após 3 horas. As massas moleculares dos peptídeos variaram de 3 a 12 kDa. O autor ainda destaca que os produtos de degradação incluindo peptídeos e aminoácidos com massas moleculares inferiores a 2,5 kDa não puderam ser completamente revelados, sendo eluídos pelo gel.

Figura 18 – Eletroforese SDS-PAGE dos hidrolisados de plasma suíno obtidos em 0 min, 15 min, 30 min, 60 min, 90 min e 120 min, nas condições otimizadas e com 4% de substrato (a) e das mesmas amostras (exceto o tempo zero) porém diluídas e padronizadas para se obter uma concentração de $5,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ (b), utilizando marcador de massa molecular de proteína de ampla faixa (M).



O conceito de “alimento funcional” se originou no início dos anos 80 no Japão. O desenvolvimento funcional de alimentos implica a incorporação de compostos bioativos específicos com efeitos fisiológicos e metabólicos no corpo humano, que não apenas fornecem nutrientes essenciais, mas também contêm substâncias que podem ter efeitos positivos a longo prazo. Diante do exposto, foi relatado por alguns autores uma comparação entre o conceito de alimento funcional na relação entre tamanho de peptídeos, sequência de aminoácidos e atividades bioativas. Bah et al. (2013) relataram o tamanho de peptídeos a partir de hidrolisados suínos (plasma, hemoglobina, albumina e globina) com a atividade antioxidante (diferentes métodos), mostrando que peptídeos <3 kDa parecem ter maior atividade antioxidante do que os peptídeos maiores em termos de poder redutor, radical DPPH, radical hidroxila e atividades de eliminação de radical superóxido. A atividade antioxidante dos hidrolisados de plasma suíno, por exemplo, foi menor para a fração peptídica acima de 10 kDa. Tem sido sugerido que a capacidade antioxidante dos biopeptídeos *in vitro* depende do tamanho do peptídeo, da composição de aminoácidos do peptídeo e da presença de aminoácidos livres dentro dos hidrolisados (RYAN et al., 2011).

Também foram relatados por Adje et al. (2011); Bah et al. (2013); Hyun; Shin (2000) o tamanho dos peptídeos com atividade inibitória da ECA de diversas fontes de sangue. Albumina bovina apresentou atividade com peptídeo <1kDa e hemoglobina bovina apresentou atividade com peptídeos de massas moleculares de 4,4 kDa, 3,6 kDa e 1,5 kDa.

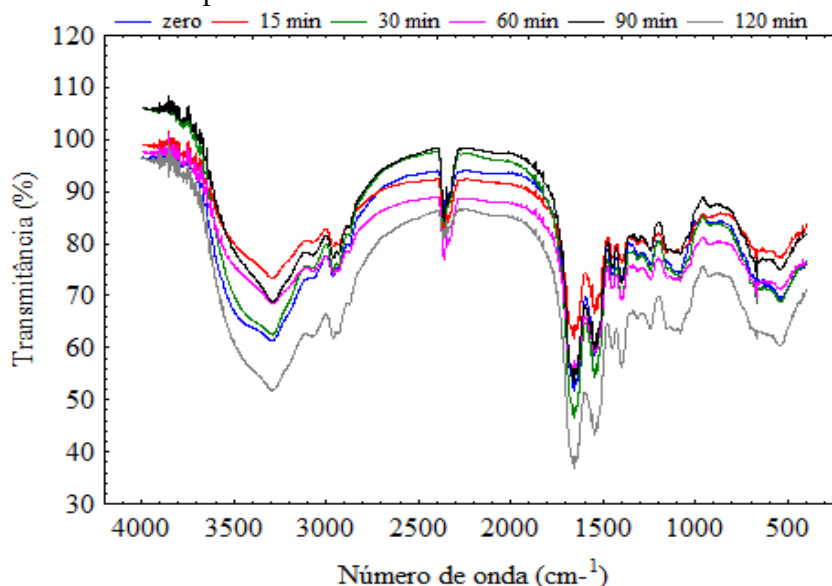
5.3.7 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) dos hidrolisados de plasma suíno

A FTIR é uma ferramenta que permite identificar grupos funcionais como carboxila, amina, hidroxila, carbonila e outros. As posições das bandas de FTIR para o plasma suíno hidrolisado quase não foram inalteradas após a hidrólise, como pode ser observado na Figura 19. Pode ter ocorrido apenas uma parcial ruptura das estruturas secundárias dos hidrolisados, provocados pela digestão da Pepsina. Comportamento parecido foi descrito por Vidal (2016) na avaliação de hidrolisados de diferentes colágenos bovinos obtidos por hidrólise enzimática assistida por ultrassom.

A eficiência da enzima é percebida com alterações em 3200 cm^{-1} (estiramentos O-H e N-H), caracterizando a atividade proteolítica da enzima bruta. Após serem quimicamente modificadas, as cadeias polissacarídicas foram ligadas às cadeias polipeptídicas da enzima. Isso faz com que a quantidade de grupos ($-\text{NH}_2$) aumente e a barreira estereoscópica é

amplificada. Isso faz com que a frequência do grupo se mova para a direção do número da onda mais alta. O pico aumenta e a intensidade de absorção desce (LI et al., 2018).

Figura 19 - Espectros de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) de plasma suíno utilizando Pepsina.



Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

Banda de absorção característica foi exibida a aproximadamente 2960 cm^{-1} (C=H). Nos espectros de FTIR do plasma suíno é possível identificar as bandas características 1664 cm^{-1} (C=O) e 1550 cm^{-1} (C=). O tratamento térmico e a hidrólise enzimática promovem a degradação de proteínas que provoca mudanças de picos de espectro de absorção para comprimentos de onda mais curtos, que são chamados de desvios azuis. A banda amida I, que se situa na região de 1600 e 1700 cm^{-1} , é a estrutura proteica mais útil para a espectroscopia de infravermelho, uma vez que envolve vibrações de estiramento C=O de grupos peptídicos (HALIM; YUSOF; SARBON, 2016).

A bandas variando em torno de 1082 cm^{-1} são atribuídas ao oxigênio da ponte assimétrica e ao estiramento da C-O, e a frequência de 1400 cm^{-1} causada por =C-H vibração de flexão. A forma, posição e intensidade relativa de todos os picos característicos estão bem preservados, o que indica nenhuma modificação apreciável na estrutura química (LI et al., 2018)

5.3.8 Atividade antimicrobiana

As atividades antimicrobianas de todos os hidrolisados, nos diferentes tempos, foram avaliadas contra bactérias Gram-positivas (*S. aureus*, *B. cereus* e *L. monocytogenes*) e Gram-negativas (*S. enteritidis* e *E. coli*), não apresentando esta atividade. Até o momento, os peptídeos

com atividades antimicrobianas da fração plasmática do sangue animal não foram relatados, como também observado no estudo realizado por Bah et al. (2015b), que utilizaram plasma separado de sangue de veado, ovelha e porco, hidrolisados com preparações de protease de fontes de plantas (papaína e bromelina) e fúngicas (FP400 e FPII).

Verma et al. (2019) testaram a atividade antimicrobiana de hidrolisados de sangue porcino, obtidos a partir do uso de diferentes proteases e em 6 h de reação, contra *E. coli*, *B. cereus*, *S. aureus* e *L. monocytogenes*. O hidrolisado obtido com o uso de Tripsina exibiu atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes* (halo de inibição de 22,58 mm) seguida de inibição do *S. aureus* (halo de inibição de 18,22 mm), *E. coli* (halo de inibição de 17,15 mm) e para *B. cereus* (halo de inibição de 16,40 mm). O hidrolisado de papaína também apresentou maior eficácia antimicrobiana contra *L. monocytogenes* (halo de inibição de 16,45 mm), *E. coli* (halo de inibição de 16,35 mm), *S. aureus* (halo de inibição de 14,45 mm) e *B. cereus* (halo de inibição de 12,73 mm). Para a amostra não hidrolisada não foi visualizado halo de inibição para todas as bactérias testadas.

Alguns autores relatam que os peptídeos antimicrobianos podem ser derivados dos fragmentos de hemoglobina de glóbulos vermelhos animais, incluindo a hidrólise da hemoglobina bovina (ADJE et al., 2011; FROIDEVAUX et al., 2001), ou dos neutrófilos (glóbulos brancos) separados do sangue animal (ANDERSON; YU, 2008; TREFFERS et al., 2005; WESSELY-SZPONDER; MAJER-DZIEDZIC; SMOLIRA, 2010).

Um dos possíveis motivos para tais hidrolisados não apresentarem atividade antimicrobiana pode ocorrer porque os peptídeos que contribuem para os mecanismos de ação antimicrobiana não estão disponíveis nessas proteínas plasmáticas, ou não foram disponibilizados por hidrólise usando a protease deste estudo. Além disso, os peptídeos com atividade antimicrobiana podem ser produzidos após os tempos de hidrólise testados, e as sequências de aminoácidos gerados não possuem atividades antimicrobianas em relação aos micro-organismos testados neste estudo (BAH et al., 2016).

Estudos foram realizados isolando e sequenciando peptídeos antimicrobianos de sangue de bovinos, suínos, ovinos, caprinos e cervinos. A hidrofobicidade do peptídeo demonstrou estar relacionada com a atividade antimicrobiana, sendo responsável na ligação de lipopolissacarídeos na membrana celular externa da bactéria. Os autores concluíram que a tirosina (Y), a arginina (R) e um aminoácido básico com carga positiva, como a lisina (K) ou a histidina (H), são necessários para a atividade antibacteriana. Peptídeos antibacterianos de neutrófilos de sangue animal poderiam ser significativamente mais ativos em combinação, recomendando que melhores resultados possam ser obtidos se os peptídeos isolados forem

usados sinergicamente (ANDERSON; YU, 2008; WESSELY-SZPONDER; MAJER-DZIEDZIC; SMOLIRA, 2010).

5.3.9 Atividade antioxidante

5.3.9.1 Atividade de eliminação de radicais DPPH

O ensaio da atividade de eliminação de radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) dos hidrolisados obtidos em diferentes tempos com Pepsina foram medidos em diferentes concentrações, como pode ser observado na Tabela 21.

A maior atividade antioxidante foi determinada na concentração de 5,0 mg.mL⁻¹, para o hidrolisado obtido aos 30 min de hidrólise, não diferindo estatisticamente do hidrolisado de 60 min e de 90 min. Em contrapartida, o menor valor de atividade antioxidante encontrado foi na concentração de 0,1 mg.mL⁻¹ para o hidrolisado de 120 min, não diferindo estatisticamente ao nível de 95% dos demais tempos analisados.

Os hidrolisados apresentaram boa atividade antioxidante, com a atividade de eliminação dos radicais permanecendo pelos períodos de tempo testados, sem grandes diferenças significativas. A capacidade de reduzir e eliminar os radicais livres por um período maior de tempo pode trazer benefícios com relação ao aumento da vida útil dos alimentos processados durante a distribuição e o armazenamento (LAFARGA; ÁLVAREZ; HAYES, 2017; LORENZO et al., 2018).

Tabela 21 - Atividade antioxidante referente a eliminação de radicais DPPH dos hidrolisados de plasma suíno obtidos com Pepsina em diferentes tempos e concentrações de proteína solúvel.

Concentração de proteína solúvel (mg.mL ⁻¹)	Tempo (min)				
	15	30	60	90	120
[5,0]	77,68 ± 0,36 ^{aB}	81,59 ± 1,07 ^{aA}	78,68 ± 1,25 ^{aAB}	81,08 ± 0,36 ^{aA}	76,29 ± 0,36 ^{aB}
[4,0]	78,50 ± 1,16 ^{aA}	78,94 ± 0,18 ^{aA}	74,27 ± 0,18 ^{aB}	77,24 ± 0,62 ^{aA}	66,96 < 0,01 ^{bC}
[3,0]	77,55 ± 0,71 ^{aA}	74,40 ± 1,61 ^{bA}	67,53 ± 0,98 ^{bB}	55,80 ± 1,52 ^{bC}	60,28 ± 0,18 ^{cC}
[2,0]	74,59 ± 0,45 ^{aA}	62,30 ± 0,36 ^{cB}	45,33 ± 1,34 ^{cC}	48,49 ± 0,98 ^{cC}	47,98 ± 1,69 ^{dC}
[1,5]	67,65 ± 1,16 ^{bA}	50,57 ± 0,54 ^{dB}	39,22 ± 1,43 ^{dC}	40,29 ± 2,05 ^{dC}	37,07 ± 0,89 ^{eC}
[1,0]	37,01 ± 1,16 ^{cA}	30,96 ± 0,80 ^{eB}	26,99 ± 0,18 ^{eC}	22,45 ± 1,07 ^{eD}	20,62 ± 0,80 ^{fD}
[0,5]	5,49 ± 1,69 ^{dA}	7,06 ± 1,07 ^{fA}	7,76 ± 0,98 ^{fA}	4,92 ± 0,89 ^{fA}	4,98 ± 2,23 ^{gA}
[0,1]	5,67 ± 0,36 ^{dA}	7,57 ± 0,54 ^{fA}	4,98 ± 2,23 ^{fA}	5,55 ± 0,71 ^{fA}	4,29 ± 1,43 ^{gA}
EC ₅₀	1,043 ^A	1,249 ^B	1,622 ^{CD}	1,596 ^C	1,661 ^D

* Médias seguidas por letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

**Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

As diferenças na capacidade de eliminação de radicais podem ser atribuídas a diferenças no rendimento dos peptídeos solúveis presentes nos hidrolisados. Hidrolisados contendo maiores níveis de peptídeos de baixa massa molecular têm sido associados à maior atividade

antioxidante (PIERRO et al., 2014). Os maiores valores de peptídeos solúveis para os hidrolisados plasmáticos da Pepsina encontrados indicam que eles têm altos níveis de peptídeos de baixa massa molecular, como demonstrado na análise da eletroforese (Figura 19), indicando que tais peptídeos poderiam estar contribuindo para a atividade antioxidante. Notou-se também que não houve correlação entre grau de hidrólise e atividade antioxidante.

A atividade antioxidante de hemoglobina suína hidrolisada com Pepsina foi investigada por Sun et al. (2011). A porcentagem de eliminação do radical DPPH do hidrolisado (1 mg.mL^{-1}) foi de 65,43%, resultados próximos foram encontrados Sun; Luo (2011) 83,0% a 2 mg.mL^{-1} e 17,8 a $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ que também obtiveram o valor de EC_{50} ($0,95 \text{ mg.mL}^{-1}$) próximo ao encontrado no presente estudo quando comparado a 15 min de hidrólise ($1,043 \text{ mg.mL}^{-1}$). Outra determinação foi encontrada por Sun; Shen; Luo (2011) na hidrólise de hemoglobina suína com Pepsina que apresentou porcentagem de eliminação do radical DPPH de 67,0% em 60 min.

Isso demonstra que tanto a hemoglobina e o plasma suíno possuem facilidade em expor os seus resíduos hidrofóbicos ou doadores de prótons inseridos no interior da molécula, facilitando a clivagem da proteína molecular, contribuindo para a atividade antioxidante dos hidrolisados.

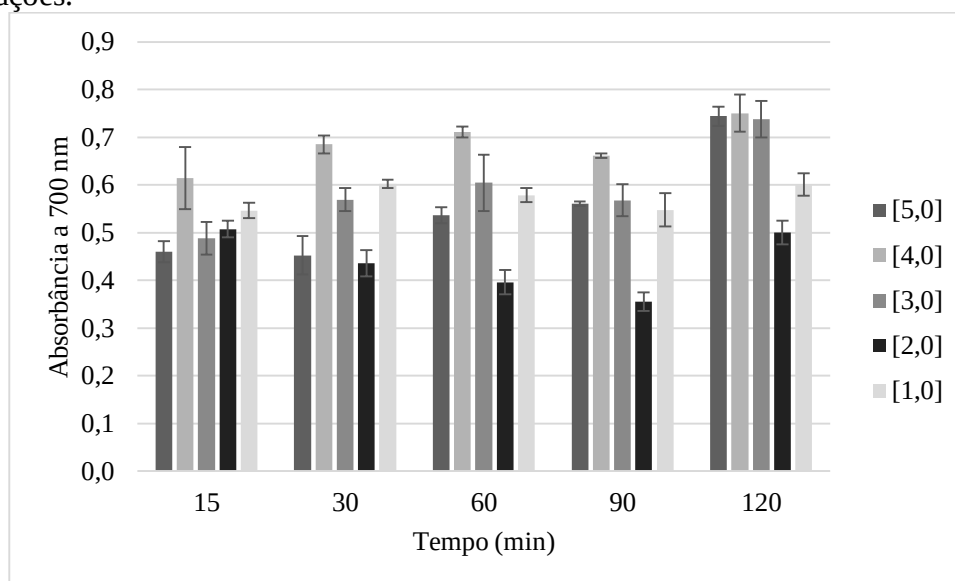
5.3.9.1 Poder antioxidante redutor de ferro

O poder antioxidante de redução férrica das amostras de plasma suíno foram determinadas e estão apresentadas na Figura 20. No presente estudo todos os hidrolisados testados nas concentrações 1, 2, 3, 4 e 5 mg.mL^{-1} tiveram a capacidade de reduzir o complexo de cianeto férrico, ao qual foram monitoradas medindo-se a absorbância a 700 nm, sendo que quanto maior a absorbância, maior o poder de redução.

O maior poder redutor foi determinado aos 120 min utilizando-se uma concentração de $4,0 \text{ mg.mL}^{-1}$, seguida da concentração de $5,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ equivalente ao mesmo tempo de hidrólise correspondendo a absorbância de 0,751 e 0,744, respectivamente.

O GH e a protease utilizada desempenham importante relação na determinação do poder redutor de hidrolisados proteicos (KLOMPONG et al., 2007). O poder redutor é considerado como uma medida direta da atividade antioxidante total, que reflete a capacidade de doação de elétrons de um antioxidante. Os compostos que apresentam poder redutor são capazes de reduzir os intermediários oxidados da peroxidação e, assim, atuam como antioxidantes (SHAHIDI; ZHONG, 2008).

Figura 20 – Poder redutor dos hidrolisados de plasma suíno analisados em diferentes tempos e concentrações.



Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

Wu; Chen; Shiai (2003) utilizaram hidrolisados de Cavala (*Scomber austriasicus*) preparados com uma enzima comercial (Protease N), e o poder redutor encontrado (0,545) se equiparam aos valores para diferentes concentrações encontradas no presente estudo utilizando Pepsina. O poder antioxidante de ferro também foi analisado por Chalamaiah et al. (2015), em hidrolisados de proteína de carpa comum (*Cyprinus carpio*), preparados por Pepsina. O resultado obtido foi de 0,686 na concentração de 5,0 mg.mL⁻¹, sendo inferior ao encontrado no estudo, mostrando a influência da fonte de substrato utilizada para hidrólise.

A atividade antioxidante apresentada pelos hidrolisados proteicos pode atuar na proteção contra danos celulares e doenças crônicas relacionadas ao estresse oxidativo. Na indústria de alimentos podem ser empregados na prevenção de reações de oxidação (como peroxidação lipídica) que levam a diminuição da vida útil, deterioração da qualidade nutricional e sensorial de alimentos (CORRÊA, 2013).

5.3.10 Ensaio de inibição da α -amilase e da α -glucosidase (atividade antidiabética)

Para a determinação da atividade antidiabética *in vitro* dos hidrolisados foi feito o estudo da atividade inibitória em duas enzimas: α -amilase e α -glucosidase. A α -amilase e a α -glucosidase são as duas principais enzimas envolvidas na digestão do amido da dieta, liberando oligossacarídeos que são digeridos em glicose, e rapidamente absorvidos pelo organismo. A inibição destas enzimas é considerada uma das abordagens mais eficazes para o controle da diabetes. O teste da α -amilase é baseado na capacidade do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) ser

reduzido pela glicose a composto nitroamino análogo (ácido 3-amino-5-nitrosalicílico), formando um produto de cor característica cuja absorbância é determinada a 540 nm (BERNFELD, 1951).

A Tabela 22 mostra os resultados obtidos para a inibição da α -amilase utilizando plasma suíno hidrolisado com Pepsina. Todos os hidrolisados obtidos nos diferentes tempos e concentrações foram capazes de inibir a atividade enzimática da α -amilase, porém em baixas porcentagens.

Tabela 22 – Percentual de inibição de α -amilase pelo plasma suíno em diferentes concentrações e tempos de hidrólise.

Concentração de proteína solúvel (mg.mL ⁻¹)	Tempo (min)				
	15	30	60	90	120
[2,0]	3,61 ± 0,13 ^{aA}	3,48 ± 0,21 ^{aAB}	3,43 ± 0,15 ^{aAB}	3,11 ± 0,20 ^{aB}	3,08 ± 0,12 ^{aB}
[1,5]	3,29 ± 0,23 ^{aA}	2,99 ± 0,27 ^{abA}	3,09 ± 0,24 ^{aA}	2,98 ± 0,45 ^{aA}	2,59 ± 0,36 ^{aA}
[1,0]	2,25 ± 0,22 ^{bA}	2,43 ± 0,13 ^{bA}	2,22 ± 0,31 ^{bA}	2,17 ± 0,25 ^{bA}	1,81 ± 0,38 ^{bA}
[0,5]	1,42 ± 0,17 ^{cA}	1,22 ± 0,25 ^{cAB}	0,95 ± 0,14 ^{cB}	1,02 ± 0,13 ^{cAB}	0,81 ± 0,17 ^{cB}
[0,1]	0,78 ± 0,20 ^{dA}	0,51 ± 0,12 ^{dAB}	0,45 ± 0,29 ^{cAB}	0,44 ± 0,11 ^{cAB}	0,25 ± 0,11 ^{cB}

* Médias seguidas por letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

**Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

Para os tempos 15, 60, 90 e 120 as concentrações 2,0 e 1,5 mg.mL⁻¹ não diferiram estatisticamente entre si, ao nível de 95% de confiança, assim como as concentrações 0,5 e 0,1 mg.mL⁻¹ para os hidrolisados dos tempos de 60 min, 90 min e 120 min. Os tempos iniciais de hidrólise apresentaram as maiores porcentagens de inibição, isso indica que a ação da protease resultou em peptídeos sem capacidade para inibir a α -amilase em tempos mais elevados.

A inibição da α -amilase humana pode dificultar a digestão dos carboidratos complexos, reduzindo a absorção e diminuindo a disponibilidade desses componentes, auxiliando na perda de peso e na diminuição da glicemia pós-prandial (LAYER, ZINSMEISTER, DIMAGNO, 1986).

Proteínas de farinha de sementes de *Moringa oleifera* foram hidrolisadas com duas enzimas proteolíticas, Pepsina e Tripsina. Os hidrolisados resultantes foram então avaliados quanto à propriedades inibitórias α -amilase e demonstraram uma inibição dependente da concentração de α -amilase com hidrolisados de Pepsina exibindo 77,59% e hidrolisados de Tripsina demonstrando 84,18% de inibição (OLUSOLA et al., 2018).

Os resultados para o ensaio de inibição de α -glucosidase estão apresentados na Tabela 23, e mostram que apenas para os tempos de hidrólise 15 e 120 min, as concentrações 2,0 e 0,1

mg.mL⁻¹ diferiram estatisticamente entre si, mostrando que com a menor concentração de hidrolisado obteve-se a menor porcentagem de inibição relacionada a α -glucosidase. Notou-se também que o tempo de hidrólise não mostrou interferir significativamente no aumento da porcentagem de inibição da α -glucosidase utilizando Pepsina.

Tabela 23 - Percentual de inibição de α -glucosidase pelo plasma suíno em diferentes concentrações e tempos de hidrólise.

Concentração de proteína solúvel (mg.mL ⁻¹)	Tempo (min)				
	15	30	60	90	120
[2,0]	2,27 ± 0,20 ^{aA}	2,19 ± 0,44 ^{aA}	2,19 ± 0,38 ^{aA}	2,00 ± 0,28 ^{aA}	2,28 ± 0,20 ^{aA}
[1,5]	1,86 ± 0,29 ^{abA}	2,08 ± 0,22 ^{aA}	1,99 ± 0,48 ^{aA}	1,96 ± 0,45 ^{aA}	1,80 ± 0,31 ^{abA}
[1,0]	1,94 ± 0,48 ^{abA}	1,77 ± 0,22 ^{aA}	1,84 ± 0,47 ^{aA}	1,83 ± 0,53 ^{aA}	1,80 ± 0,13 ^{abA}
[0,5]	1,68 ± 0,76 ^{abA}	1,54 ± 0,59 ^{aA}	1,52 ± 0,65 ^{aA}	1,34 ± 0,67 ^{aA}	1,28 ± 0,42 ^{abA}
[0,1]	0,82 ± 0,71 ^{bA}	0,88 ± 0,76 ^{aA}	0,88 ± 0,76 ^{aA}	0,95 ± 0,83 ^{aA}	0,93 ± 0,81 ^{bA}

* Médias seguidas por letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

**Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

Proteínas de sementes de melancia (*Citrullus lanatus* L.) foram hidrolisadas usando Pepsina e Tripsina e investigados quanto à propriedade inibitórias da α -amilase em diferentes concentrações. Nas concentrações 0,5; 1,0; 1,5; e 2,0 mg.mL⁻¹ a inibição da α -amilase para Pepsina foi de 62,74%, 65,22%, 68,73% e 69,81%, respectivamente. E para Tripsina nas mesmas concentrações a inibição da enzima foi de 65,91%, 71,07%, 78,15% e 83,00% (ARISE; YEKEEN; EKUN, 2016).

O potencial inibitório do extrato aquoso de lúpulo (*Humulus lupulus* L.) sobre as enzimas digestivas foram testadas por Marques et al. (2014), e apresentaram inibição de α -amilase de 80,91% e para α -glicosidase de 40,96%.

A inibição da α -amilase e a α -glicosidase do hidrolisado proteico obtido de semente de *Luffa cylindrica* utilizando Pepsina foi verificada por Olusanya et al. (2019). O hidrolisado péptico expressou inibição contra a α -amilase de 18,89% e com inibição percentual de 51,96% contra α -glucosidase na qual a porcentagem de inibição reduziu à medida que a concentração do hidrolisado de semente de *Luffa cylindrica* foi aumentada.

Outras porcentagens de inibição tem sido relatadas for fontes de hidrolisados como, feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) (DE SOUZA ROCHA et al., 2015; OSEGUERA-TOLEDO; GONZALEZ DE MEJIA; AMAYA-LLANO, 2015), feijão branco (PEREIRA, 2011), variedades de pimenta (OBOH; ADEMILUYI; FALOYE, 2011), gema de ovo (ZAMBROWICZ et al., 2015), extratos de Labiatae (ROUZBEHAN et al., 2017), extrato de

folhas de *Mouriri elliptica* Martius (SILVA, 2016), frutas nativas (BALISTEIRO, 2013), frutos da família Myrtaceae (PACHECO, 2015), farelo de arroz (URAIPOG; ZHAO, 2016), lentilha (*Lens culinaris*) (CASARIN, 2018) e extratos aquosos de plantas selvagens da região do Algarve (Portugal) (VIEGAS, 2017). Tais estudos relatam que os efeitos hipoglicemiantes destas fontes ocorrem principalmente pela presença dos metabólitos secundários que estão envolvidos em processos de defesa e proteção, como esteroides flavonoides (polifenóis), taninos, terpenos, triterpenóides, alcaloides, antocianinas, entre outros.

5.3.11 Atividade inibitória da enzima conversora da angiotensina-I (atividade anti-hipertensiva)

Os hidrolisados de proteína de plasma suíno (2,0 mg.mL⁻¹) foram testados quanto à sua atividade inibitória de ECA e estão apresentados na Tabela 24. Os peptídeos com baixa massa molecular são relatados como tendo melhor atividade inibitória da ECA do que os maiores. Os peptídeos com massa molecular <1 kDa estão associados a melhores propriedades benéficas para a saúde (LI-CHAN, 2015).

Tabela 24 – Atividade inibitória da ECA de plasma suíno preparado com Pepsina influenciados pelo tempo de hidrólise.

Concentração de proteína solúvel (mg.mL ⁻¹)	Tempo (min)				
	15	30	60	90	120
[2,0]	15,41 ± 0,30 ^A	10,65 ± 0,40 ^B	10,72 ± 0,70 ^B	10,44 ± 1,31 ^B	8,17 ± 0,50 ^B

*Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

Segundo Norris; Fitzgerald (2013), isso pode estar relacionado aos sítios ativos contendo a sequência His-Glu-XX-His, que estão localizados dentro da fenda dos dois domínios da ECA (C e N). Os locais ativos são protegidos por uma “tampa” N-terminal que bloqueia o acesso de grandes polipeptídios. Assim, pequenos peptídeos são mais eficazes inibindo a atividade da ECA.

Os resultados indicam que o hidrolisado em 15 min produziu os peptídeos com maior atividade inibitória da ECA (15,41%), se diferenciando estatisticamente ($p < 0,05$) dos demais tempos, havendo a redução na atividade. Os peptídeos inibitórios da ECA gerados após os 15 min podem ter sido clivados em locais que não facilitam a inibição da ECA (GARCÍA-MORENO et al., 2015).

Foi possível verificar também que o maior GH obtido em 120 min exibiu a menor atividade, não havendo correlação entre parâmetros de GH e tempo de hidrólise. As diferenças

nas atividades inibitórias da ECA podem ser devidas às diferentes propriedades hidrofílicas-hidrofóbicas e as diferentes massas moleculares e sequências de aminoácidos dos peptídeos gerados (LASSOUED et al., 2015).

Os hidrolisados gerados pela hidrólise de plasma suíno apresentam atividade biológica satisfatória, uma vez que a análise foi realizada com os extratos brutos, sem nenhum processo de purificação e separação, sendo possível estudos complementares para sua aplicação na formulação de alimentos funcionais e no desenvolvimento de fármacos.

5.4 Conclusão

Este estudo mostrou que a hidrólise de plasma suíno com Pepsina sob condições específicas de hidrólise (pH, temperatura e agitação) é um procedimento promissor para a preparação de hidrolisados com bioatividades. O plasma suíno hidrolisado demonstrou ser um potente sequestrador de radicais livres, podendo ser um antioxidante potencial para aplicação nas indústrias de alimentos, cosméticos e medicina atuando contra o dano oxidativo.

Muitos efeitos positivos esperados para o processamento de resíduos podem ser alcançados pela hidrólise de proteínas usando proteases específicas, alterando suas propriedades nutricionais, bioativas e funcionais, que incluem melhor digestibilidade, modificações da qualidade sensorial (como textura ou sabor), e melhora de diversas atividades.

Muitas atividades não apresentaram valores de inibição elevados, porém para uma melhor avaliação destas, faz-se necessário a purificação destes hidrolisados, a fim de identificar as sequencias bioativas específicas. Métodos de purificação como ultrafiltração, vários tipos de cromatografia, colunas de carvão ativado e ultrafiltração por eletrodialise poderiam ser aplicadas. Além disso, a técnica de espectrometria de massa poderia ser utilizada para caracterização da estrutura e quantificação desses peptídeos bioativos, e a realização do sequenciamento dos aminoácidos dos hidrolisados dos diferentes tempos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADJE, E. Y., BALTI, R., KOUACH, M., DHULSTER, P., GUILLOCHON, D., NEDJAR-ARROUME, N. Obtaining antimicrobial peptides by controlled peptic hydrolysis of bovine hemoglobin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 49, n. 2, p. 143–153, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.04.004>
- ADLER-NISSEN, J. Determination of the Degree of Hydrolysis of Food Protein Hydrolysates by Trinitrobenzenesulfonic Acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 27, n. 6, p. 1256–1262, 1979. <https://doi.org/10.1021/jf60226a042>
- AHHMED, A. M., MUGURUMA, M. A review of meat protein hydrolysates and hypertension. **Meat Science**, v. 86, n. 1, p. 110–118, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.04.032>
- AHN, C., JEON, Y., KIM, Y., JE, J. Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from salmon byproduct protein hydrolysate by Alcalase hydrolysis. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 12, p. 2240–2245, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.08.019>
- ALUKO, R. E., GIRGIH, A. T., HE, R., MALOMO, S., LI, H., OFFENGENDEN, M., WU, J. Structural and functional characterization of yellow field pea seed (*Pisum sativum* L.) protein-derived antihypertensive peptides. **Food Research International**, v. 77, p. 10–16, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.03.029>
- ÁLVAREZ, C., BANCES, M., RENDUELES, M., DÍAZ, M. Functional properties of isolated porcine blood proteins. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 44, n. 4, p. 807–814, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.01908.x>
- ÁLVAREZ, C., GARCÍA, V., RENDUELES, M., DÍAZ, M. Functional properties of isolated porcine blood proteins modified by Maillard's reaction. **Food Hydrocolloids**, v. 28, n. 2, p. 267–274, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.01.001>
- AMBIGAIPALAN, P., AL-KHALIFA, A. S., SHAHIDI, F. Antioxidant and angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activities of date seed protein hydrolysates prepared using Alcalase, Flavourzyme and Thermolysin. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 1125–1137, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.021>
- ANDERSON, R. C., YU, P. Pilot-scale extraction and antimicrobial activity of crude extract from ovine neutrophils. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 882–886, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.04.005>
- ANGUIZOLA, J., MATSUDA, R., BARNABY, O. S., HOY, K. S., WA, C., DEBOLT, E., KOTE, M., HAGE, D. S. Review: Glycation of human serum albumin. **Clinica Chimica Acta**, v. 425, p. 64–76, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2013.07.013>
- ANSORENA, D., PEFIA, M. P. DE, ASTIASARHN, I., BELLO, J. Colour Evaluation of Chorizo de Pamplona, a Spanish Dry Fermented Sausage: Comparison Between the CIE L* a* b* and the Hunter Lab Systems with Illuminants D65 and C. **Meat Science**, v. 46, n. 4, p. 313–318, 1997.

APOSTOLIDIS, E., KWON, Y., SHETTY, K. Inhibitory potential of herb , fruit , and fungal-enriched cheese against key enzymes linked to type 2 diabetes and hypertension. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 8, p. 46–54, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2006.06.001>

ARISE, R. O., YEKEEN, A. A., EKUN, O. E. In vitro antioxidant and α -amylase inhibitory properties of watermelon seed protein hydrolysates. **Environmental and Experimental Biology**, v. 14, p. 163–172, 2016. <http://doi.org/10.22364/eeb.14.23>

ASPMO, S. I., HORN, S. J., EIJSINK, V. G. H. Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1957–1966, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.07.011>

BAH, C. S. F., BEKHIT, A. E.-D. A., CARNE, A., MCCONNELL, M. A. Production of bioactive peptide hydrolysates from deer, sheep, pig and cattle red blood cell fractions using plant and fungal protease preparations. **Food Chemistry**, v. 176, p. 54–63, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.020>

BAH, C. S. F., BEKHIT, A. E.-D. A., MCCONNELL, M. A., CARNE, A. Generation of bioactive peptide hydrolysates from cattle plasma using plant and fungal proteases. **Food Chemistry**, v. 213, p. 98–107, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.065>

BAH, C. S. F., BEKHIT, A. E. A., CARNE, A., MCCONNELL, M. A. Production of bioactive peptide hydrolysates from deer , sheep and pig plasma using plant and fungal protease preparations. **Food Chemistry**, v. 176, p. 54–63, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.025>

BAH, C. S. F., BEKHIT, A. E. D. A., CARNE, A., MCCONNELL, M. A. Slaughterhouse blood: An emerging source of bioactive compounds. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, n. 3, p. 314–331, 2013. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12013>

BAIG, MOHAMMAD HASSAN, AHMAD, K., SAEED, M., ALHARBI, A. M., BARRETO, G. E., ASHRAF, G. M., CHOI, I. Peptide based therapeutics and their use for the treatment of neurodegenerative and other diseases. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 103, p. 574–581, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.04.025>

BAIG, MOHD HASSAN, SUDHAKAR, D. R., KALAIARASAN, P., SUBBARAO, N., WADHAWA, G., LOHANI, M., KHAN, A. M. KALIM., KHAN, A. U. (2014). Insight into the effect of inhibitor resistant S130G mutant on physico-chemical properties of SHV type beta-lactamase: A molecular dynamics study. **Plos One**, v. 9, n. 12, p. 1–19, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112456>

BALISTEIRO, D. M. **Efeito dos compostos fenólicos de frutas nativas brasileiras na glicemia pós prandial**. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. São Paulo, p. 1-88, 2013. <https://doi.org/10.11606/D.9.2017.tde-05042017-111845>

BALTI, R., BOUGATEF, A., EL HADJ ALI, N., KTARI, N., JELLOULI, K., NEDJAR-ARROUME, N., DHULSTER, P., NASRI, M. Comparative Study on Biochemical Properties and Antioxidative Activity of Cuttlefish (*Sepia officinalis*) Protein Hydrolysates Produced by

Alcalase and *Bacillus licheniformis* NH1 Proteases. **Journal of Amino Acids**, v. 2011, p. 1–11, 2011. <https://doi.org/10.4061/2011/107179>

BARBANA, C., BOYE, J. I. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of lentil protein hydrolysates: Determination of the kinetics of inhibition. **Food Chemistry**, v. 127, n. 1, p. 94–101, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.093>

BEN SLAMA-BEN SALEM, R., BKHAIIRA, I., ABDELHEDI, O., NASRI, M. Octopus vulgaris protein hydrolysates: characterization, antioxidant and functional properties. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 6, p. 1442–1454, 2017. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2567-y>

BERDARDI, D. M., PARIS, L. D. DE, DIETERICH, F., SILVA, F. G. D. E, BOSCOLO, W. R., SARY, C., SIGNOR, A., BERTOL, T. M., SGARBIERI, V. C. Production of hydrolysate from processed Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) residues and assessment of its antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v. 36, n. 4, p. 709–716, 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-457X.15216>

BERNFELD, P. Enzymes of starch degradation and synthesis. **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**, v. 12, p. 380–424, 1951. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9780470122570.ch7>

BONEV, B., HOOPER, J., PARISOT, J. Principles of assessing bacterial susceptibility to antibiotics using the agar diffusion method. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, n. 6, p. 1295–1301, 2008. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn090>

BOUGATEF, A., NEDJAR-ARROUME, N., RAVALLEC-PLÉ, R., LEROY, Y., GUILLOCHON, D., BARKIA, A., NASRI, M. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activities of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products protein hydrolysates obtained by treatment with microbial and visceral fish serine proteases. **Food Chemistry**, v. 111, n. 2, p. 350–356, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.03.074>

BRITO, R. G. DE. **Produção de amilase por *Aspergillus flavus* isolado a partir da mandioca (*Manihot esculenta*)**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas. Amazonas, AM, p. 1-54, 2017.

BUENO-SOLANO, C., LÓPEZ-CERVANTES, J., CAMPAS-BAYPOLI, O. N., LAUTERIO-GARCÍA, R., ADAN-BANTE, N. P., SÁNCHEZ-MACHADO, D. I. Chemical and biological characteristics of protein hydrolysates from fermented shrimp by-products. **Food Chemistry**, v. 112, p. 671–675, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.029>

CARVALHO, M. L. DE. **Estudo Cinético da Hidrólise Enzimática de Celulose de Bagaço de Cana-de-Açúcar**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, p.1-102, 2011.

CASARIN, A. L. F. **Propriedades antioxidantes e antidiabéticas de compostos bioativos de lentilha (*Lens culinaris*) obtidos a partir de grãos in natura, germinados e tratados enzimaticamente**. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP, p. 1-99, 2018.

CATIAU, L., TRAISNEL, J., CHIHIB, N., LE, G., BLANPAIN, A., MELNYK, O., GUILLOCHON, D., NEDJAR-ARROUME, N. Peptides RYH : A minimal peptidic sequence obtained from beta-chain hemoglobin exhibiting an antimicrobial activity. **Peptides**, v. 32, n. 7, p. 1463–1468, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.05.021>

CHALAMAIAH, M., JYOTHIRMAYI, T., BHASKARACHARY, K., VAJRESWARI, A., HEMALATHA, R., DINESH KUMAR, B. Chemical composition, molecular mass distribution and antioxidant capacity of rohu (*Labeo rohita*) roe (egg) protein hydrolysates prepared by gastrointestinal proteases. **Food Research International**, v. 52, n. 1, p. 221–229, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.03.020>

CHALAMAIAH, M., JYOTHIRMAYI, T., DIWAN, P. V., DINESH KUMAR, B. Antioxidant activity and functional properties of enzymatic protein hydrolysates from common carp (*Cyprinus carpio*) roe (egg). **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 9, p. 5817–5825, 2015. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1714-6>

CHALAMAIAH, MERAM, YU, W., WU, J. Immunomodulatory and anticancer protein hydrolysates (peptides) from food proteins: A review. **Food Chemistry**, v. 245, p. 205–222, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.087>

CHANG, C. Y., WU, K. C., CHIANG, S. H. (2007). Antioxidant properties and protein compositions of porcine haemoglobin hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 100, n. 4, p. 1537–1543, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.12.019>

CHI, C. F., CAO, Z. H., WANG, B., HU, F. Y., LI, Z. R., & ZHANG, B. Antioxidant and functional properties of collagen hydrolysates from Spanish mackerel skin as influenced by average molecular weight. **Molecules**, v. 19, n. 8, p. 11211–11230, 2014. <https://doi.org/10.3390/molecules190811211>

CORRÊA, A. P. F. (2013). **Obtenção de peptídeos bioativos a partir da hidrólise enzimática de caseinato ovino e soro de queijo ovino**. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, p. 1-101, 2013.

CUMBY, N., ZHONG, Y., NACZK, M., SHAHIDI, F. Antioxidant activity and water-holding capacity of canola protein hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 109, n. 1, p. 144–148, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.12.039>

DAMGAARD, T. D., OTTE, J. A. H., MEINERT, L., JENSEN, K., LAMETSCH, R. Antioxidant capacity of hydrolyzed porcine tissues. **Food Science & Nutrition**, v. 2, n. 3, p. 282–288, 2014. <https://doi.org/10.1002/fsn3.106>

DÀVILA, E., PARÉS, D., CUVELIER, G., RELKIN, P. Heat-induced gelation of porcine blood plasma proteins as affected by pH. **Meat Science**, v. 76, n. 2, p. 216–225, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.11.002>

DÀVILA, E., SAGUER, E., TOLDRÀ, M., CARRETERO, C., PARÉS, D. Surface functional properties of blood plasma protein fractions. **European Food Research and Technology**, v. 226, n. 1–2, p. 207–214, 2007. <https://doi.org/10.1007/s00217-006-0527-2>

DE SOUZA ROCHA, T., HERNANDEZ, L. M. R., MOJICA, L., JOHNSON, M. H., CHANG, Y. K., GONZÁLEZ DE MEJÍA, E. Germination of *Phaseolus vulgaris* and alcalase hydrolysis of its proteins produced bioactive peptides capable of improving markers related to type-2 diabetes in vitro. **Food Research International**, v. 76, p. 150–159, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.04.041>

DENG, H. L., ZHENG, J., ZHANG, F., WANG, Y., KAN, J. Isolation of angiotensin I-converting enzyme inhibitor from pepsin hydrolysate of porcine hemoglobin. **European Food Research and Technology**, v. 239, n. 6, p. 933–940, 2014. <https://doi.org/10.1007/s00217-014-2290-0>

DI BERNARDINI, R., HARNEDY, P., BOLTON, D., KERRY, J., O'NEILL, E., MULLEN, A. M., HAYES, M. (2011). Antioxidant and antimicrobial peptidic hydrolysates from muscle protein sources and by-products. **Food Chemistry**, 124(4), 1296–1307. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.004>

DI BERNARDINI, R., MULLEN, A. M., BOLTON, D., KERRY, J., O'NEILL, E., HAYES, M. Assessment of the angiotensin-I-converting enzyme (ACE-I) inhibitory and antioxidant activities of hydrolysates of bovine brisket sarcoplasmic proteins produced by papain and characterisation of associated bioactive peptidic fractions. **Meat Science**, v. 90, n. 1, p. 226–235, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.07.008>

DRYÁKOVÁ, A., PIHLANTO, A., MARNILA, P., ČURDA, L., KORHONEN, H. J. T. Antioxidant properties of whey protein hydrolysates as measured by three methods. **European Food Research and Technology**, v. 230, n. 6, p. 865–874, 2010. <https://doi.org/10.1007/s00217-010-1231-9>

ELAVARASAN, K., SHAMASUNDAR, B. A. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of protein hydrolysates prepared from three freshwater carps (*Catla catla*, *Labeo rohita* and *Cirrhinus mrigala*) using Flavorzyme. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 49, p. 1344–1350, 2014. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12435>

ERDMANN, K., CHEUNG, B. W. Y., SCHRÖDER, H. The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 19, n. 10, p. 643–654, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2007.11.010>

ERDÖS, E. G., TAN, F., SKIDGEL, R. A. Angiotensin I-converting enzyme inhibitors are allosteric enhancers of kinin B1 and B2 receptor function. **Hypertension**, v. 55, n. 2, p. 214–220, 2010. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.144600>

EVANGELHO, J. A. DO, VANIER, N. L., PINTO, V. Z., BERRIOS, J. J. D., DIAS, A. R. G., ZAVAREZE, E. DA R. Black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein hydrolysates: Physicochemical and functional properties. **Food Chemistry**, v. 214, p. 460–467, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.046>

FAGUNDES, P.; KEMPKA, A.P. **Plasma e hemácia suínos: perfil de aminoácidos, otimização da hidrólise enzimática e digestibilidade dos hidrolisados**. Monografia de Especialização em Ciência e Tecnologia de Alimentos. UDESC, 2014.

FLEISCHER, D. M., VENTER, C., VANDENPLAS, Y. Hydrolyzed Formula for Every

Infant? **Nestle Nutrition Institute Workshop Series**, v. 86, p. 51–65, 2016.
<https://doi.org/10.1159/000442956>

FROIDEVAUX, R., KRIER, F. Y., NEDJAR-ARROUME, N., VERCAIGNE-MARKO, D., KOSCIARZ, E., RUCKEBUSCH, C., DHULSTER, P., GUILLOCHON, D. Antibacterial activity of a pepsin-derived bovine hemoglobin fragment. **Federation of European Biochemical Societies**, v. 491, p. 159–163, 2001.

FU, Y., LIU, J., HANSEN, E. T., BREDIE, W. L. P., LAMETSCH, R. Structural characteristics of low bitter and high umami protein hydrolysates prepared from bovine muscle and porcine plasma. **Food Chemistry**, v. 257, p. 163–171, 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.159>

FUJINAGA, M., CHERNAIA, M. M., TARASOVA, N. I., MOSIMANN, S. C., JAMES, M. N. G., BOX, P. O. B. Crystal structure of human pepsin and its complex with pepstatin. **Protein Science**, v. 4, p. 960–972, 1995. <https://doi.org/10.1002/pro.5560040516>.

FURUTA, T., MIYABE, Y., YASUI, H., KINOSHITA, Y., KISHIMURA, H. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides derived from phycobiliproteins of dulce *Palmaria palmata*. **Marine Drugs**, v. 14, n. 2, p. 1–10, 2016. <https://doi.org/10.3390/md14020032>

GALLEGO, M., MORA, L., TOLDRÁ, F. Health relevance of antihypertensive peptides in foods. **Current Opinion in Food Science**, v. 19, p. 8–14, 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.12.004>

GARCÍA-MORENO, P. J., ESPEJO-CARPIO, F. J., GUADIX, A., GUADIX, E. M. Production and identification of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from Mediterranean fish discards. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 95–105, 2015.
<https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.062>

GARCÍA-MORENO, P. J., PÉREZ-GÁLVEZ, R., ESPEJO-CARPIO, F. J., RUIZ-QUESADA, C., PÉREZ-MORILLA, A. I., MARTÍNEZ-AGUSTÍN, O., GUADIX, A., GUADIX, E. M. Functional, bioactive and antigenicity properties of blue whiting protein hydrolysates: effect of enzymatic treatment and degree of hydrolysis. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 1, p. 299–308, 2016. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7731>

GONZALEZ-TELLO, P., CAMACHO, F., E. JURADO, M. P. P., GUADIX, E. M. Enzymatic Hydrolysis of Whey Proteins: I. Kinetic Models. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 44, p. 523–528, 1994. <https://doi.org/10.1002/bit.260440415>

GOTO, S., TOMITA, A. Antithrombotic therapy for prevention of various thrombotic diseases. **Drug Development Research**, v. 74, n. 8, p. 568–574, 2013.
<https://doi.org/10.1002/ddr.21116>

GÜLÇİN, I., MSHVILDADZE, V., GEPDIREMEN, A., ELIAS, R. The antioxidant activity of a triterpenoid glycoside isolated from the berries of *Hedera colchica*: 3-O-(β -D-glucopyranosyl)-hederagenin. **Phytotherapy Research**, p. 20, n. 2, p. 130–134, 2006.
<https://doi.org/10.1002/ptr.1821>

HALIM, N. R. A., YUSOF, H. M., SARBON, N. M. Functional and bioactive properties of

fish protein hydrolsates and peptides: A comprehensive review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 51, p. 24–33, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.02.007>

HAMMERSHØJ, M., NEBEL, C., CARSTENS, J. H. Enzymatic hydrolysis of ovomucin and effect on foaming properties. **Food Research International**, v. 41, n. 5, p. 522–531, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.03.004>

HANAFI, M. A., HASHIM, S. N., CHAY, S. Y., EBRAHIMPOUR, A., ZAREI, M., MUHAMMAD, K., ABDUL-HAMID, A., SAARI, N. High angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory activity of Alcalase-digested green soybean (*Glycine max*) hydrolysates. **Food Research International**, v. 106, p. 589–597, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.01.030>

HARTMANN, R., MEISEL, H. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, p. 163–169, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.01.013>

HE, R., ALASHI, A., MALOMO, S. A., GIRGIH, A. T., CHAO, D., JU, X., ALUKO, R. E. Antihypertensive and free radical scavenging properties of enzymatic rapeseed protein hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 141, n. 1, p. 153–159, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.02.087>

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B., DEL MAR CONTRERAS, M., RECIO, I. Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into foods. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 165, n. 1, p. 23–35, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2010.11.001>

HOLANDA, H. D. DE, NETTO, F. Recovery of Components from Shrimp (*Litopenaeus setiferus*) Processing Waste by Enzymatic Hydrolysis. **Food Chemistry and Toxicology**, v. 71, n. 5, p. 298–303, 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00040.x>

HOU, Y., WU, Z., DAI, Z., WANG, G., WU, G. Protein hydrolysates in animal nutrition: Industrial production, bioactive peptides, and functional significance. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 8, n. 1, p. 1–13, 2017. <https://doi.org/10.1186/s40104-017-0153-9>

HOWELL, N. K., LAWRIE, R. A. Functional aspects of blood plasma proteins. II. **Journal of Food Technology**, v. 22, n. 2, p. 145–151, 1987. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1987.tb00469.x>

HOYLE, N. T., MERRITT, J. H. Quality of Fish Protein Hydrolysates from Herring (*Clupea harengus*). **Journal of Food Science**, v. 59, n. 1, p. 1–4, 1994. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1994.tb06901.x>

HOYO, P. DEL, MOURE, F., RENDUELES, M. Demineralization of animal blood plasma by ion exchange and ultrafiltration. **Meat Science**, v. 76, p. 402–410, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.06.014>

HRČKOVÁ, M., RUSŇÁKOVÁ, M., ZEMANOVIČ, J. Enzymatic Hydrolysis of Defatted Soy Flour by Three Different Proteases and their Effect on the Functional Properties of Resulting Protein Hydrolysates. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 20, n. 1, p. 7–14, 2002.

<https://doi.org/10.3923/ajft.2009.226.240>

HYUN, C.-K., SHIN, H.-K. Utilization of bovine blood plasma proteins for the production of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. **Process Biochemistry**, v. 36, n. 1–2, p. 65–71, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00176-X](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00176-X)

INDUMATHI, P., MEHTA, A. A novel anticoagulant peptide from the Nori hydrolysate. **Journal of Functional Foods**, v. 20, p. 606–617, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.11.016>

JAMDAR, S. N., RAJALAKSHMI, V., PEDNEKAR, M. D., JUAN, F., YARDI, V., SHARMA, A. Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate. **Food Chemistry**, v. 121, n. 1, p. 178–184, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.12.027>

JE, J. Y., QIAN, Z. J., BYUN, H. G., KIM, S. K. Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 5, p. 840–846, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.02.006>

KAGEYAMA, T. Pepsinogens, progastricsins, and prochymosins: Structure, function, evolution, and development. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 59, n. 2, p. 288–306, 2002. <https://doi.org/10.1007/s00018-002-8423-9>

KARAMI, Z.; AKBARI-ADERGANI, B. Bioactive food derived peptides : a review on correlation between structure of bioactive peptides and their functional properties. **Journal of Food Science and Technology**, v. 56, n. 2, p. 535–547, 2019. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3549-4>

KIM, E. K., LEE, S. J., JEON, B. T., MOON, S. H., KIM, B. K., PARK, T. K., HAN, J. S., PARK, P. J. Purification and characterisation of antioxidative peptides from enzymatic hydrolysates of venison protein. **Food Chemistry**, v. 114, n. 4, p. 1365–1370, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.035>

KIM, M., KIM, E., KWAK, H. S., JEONG, Y. The ingredients in Saengshik , a formulated health food , inhibited the activity of α -amylase and α -glucosidase as anti-diabetic function. **Nutrition Research and Practice**, v. 8, n. 5, p. 602–606, 2014. <https://doi.org/10.4162/nrp.2014.8.5.602>

KLOMPONG, V., BENJAKUL, S., KANTACHOTE, D., SHAHIDI, F. Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. **Food Chemistry**, v. 102, p. 1317–1327, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.07.016>

KORHONEN, H., PIHLANTO, A. Bioactive peptides: Production and functionality. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 9, p. 945–960, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.10.012>

KOTLAR, C. E., PONCE, A. G., ROURA, S. I. Improvement of functional and antimicrobial properties of brewery byproduct hydrolysed enzymatically. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, n. 2, p. 378–385, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.09.005>

KRISTINSSON, H. G. 1. ed. **Antioxidants and Functional Components in Aquatic Foods**. Wiley-Blackwell, 2014 <https://doi.org/10.1002/9781118855102>

KRISTINSSON, H. G., RASCO, B. A. Fish Protein Hydrolysates : Production , Biochemical , and Functional Properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 40, n. 1, p. 43–81, 2000. <https://doi.org/10.1080/10408690091189266>

KUMAR, D., CHATLI, M. K., SINGH, R., MEHTA, N., KUMAR, P. Antioxidant and antimicrobial activity of camel milk casein hydrolysates and its fractions. **Small Ruminant Research**, v. 139, p. 20–25, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.05.002>

KUROZAWA, L. E., PARK, K. J., HUBINGER, M. D. Influência das condições de processo na cinética de hidrólise enzimática de carne de frango. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 3, p. 557–566, 2009.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature Publishing Group**, v. 227, p. 680–685, 1970.

LAFARGA, T., ÁLVAREZ, C., HAYES, M. Bioactive peptides derived from bovine and porcine co-products: A review. **Journal of Food Biochemistry**, v. 41, n. 6, p. 1–18, 2017. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12418>

LAFARGA, T., HAYES, M. Bioactive peptides from meat muscle and by-products: Generation, functionality and application as functional ingredients. **Meat Science**, v. 98, n. 2, p. 227–239, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.05.036>

LAKSHMI, B. K. M., MUNI KUMAR, D., HEMALATHA, K. P. J. Purification and characterization of alkaline protease with novel properties from *Bacillus cereus* strain S8. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 295–304, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.05.009>

LASSOUED, I., MORA, L., NASRI, R., AYDI, M., TOLDRÁ, F., ARISTOY, M. C., BARKIA, A., NASRI, M. Characterization, antioxidative and ACE inhibitory properties of hydrolysates obtained from thornback ray (*Raja clavata*) muscle. **Journal of Proteomics**, v. 128, p. 458–468, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.05.007>

LAYER, P., ZINSMEISTER, A. R., DIMAGNO, E. P. Effects of Decreasing Intraluminal Amylase Activity on Starch Digestion and Postprandial Gastrointestinal Function in Humans. **Gastroenterology**, v. 91, n. 1, p. 41–48, 1986. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(86\)90436-1](https://doi.org/10.1016/0016-5085(86)90436-1)

LEE, S. H., SONG, K. BIN. Purification of an iron-binding nona-peptide from hydrolysates of porcine blood plasma protein. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 3, p. 378–381, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.12.001>

LI-CHAN, E. C. Y. Bioactive peptides and protein hydrolysates: Research trends and challenges for application as nutraceuticals and functional food ingredients. **Current Opinion in Food Science**, v. 1, n. 1, p. 28–37, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2014.09.005>

LI, C., HUANG, Z., DONG, L., LIU, X. Improvement of enzymological properties of pepsin

by chemical modification with chitoooligosaccharides. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 118, p. 216–227, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.060>

LI, G. H., LE, G. W., SHI, Y. H., SHRESTHA, S. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmacological effects. **Nutrition Research**, v. 24, n. 7, p. 469–486, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2003.10.014>

LI, X., DENG, J., SHEN, S., LI, T., YUAN, M., YANG, R., DING, C. Antioxidant activities and functional properties of enzymatic protein hydrolysates from defatted *Camellia oleifera* seed cake. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 9, p. 5681–5690, 2015. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1693-z>

LICEAGA, A. M., HALL, F. (2018). **Nutritional, Functional and Bioactive Protein Hydrolysates. Reference Module in Food Science**. 2018. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.21776-9>

LIU, Q., KONG, B., XIONG, Y. L., XIA, X. Antioxidant activity and functional properties of porcine plasma protein hydrolysate as influenced by the degree of hydrolysis. **Food Chemistry**, v. 118, n. 2, p. 403–410, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.05.013>

LORENZO, J. M., MUNEKATA, P. E. S., GÓMEZ, B., BARBA, F. J., MORA, L., PÉREZ-SANTAESCOLÁSTICA, C., TOLDRÁ, F. Bioactive peptides as natural antioxidants in food products – A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 79, p. 136–147, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.003>

LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., RANDALL, R. J. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.

LUO, Q., CHEN, D., BOOM, R. M., JANSSEN, A. E. M. Revisiting the enzymatic kinetics of pepsin using isothermal titration calorimetry. **Food Chemistry**, v. 268, p. 94–100, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.042>

LUO, Y., PAN, K., ZHONG, Q. Physical, chemical and biochemical properties of casein hydrolyzed by three proteases: Partial characterizations. **Food Chemistry**, v. 155, p. 146–154, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.048>

LYNCH, S. A., MULLEN, A. M., O'NEILL, E. E., GARCÍA, C. Á. Harnessing the Potential of Blood Proteins as Functional Ingredients: A Review of the State of the Art in Blood Processing. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 16, n. 2, p. 330–344, 017. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12254>

MANNHEIM, A.; CHERYAN, M. Continuous Hydrolysis of Milk Protein in a Membrane Reactor. **Journal of Food Science**, v. 55, n. 2, p. 381–385, 1990. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1990.tb06769.x>

MARQUES, T. R., LOPES, L., PEREIRA, S., SIMÃO, A. A., RAMOS, V. D. O., BRAGA, M. A., CORRÊA, A. D., DONIZETE, C. Inibição de enzimas digestivas por pellets de lúpulo (*Humulus lupulus* L.). **Brazilian Journal of Biosciences**, v. 12, n. 4, p. 183–187, 2014.

MÁRQUEZ, M. C., VÁZQUEZ, M. A. Modeling of enzymatic protein hydrolysis. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 111–117, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(99\)00041-2](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(99)00041-2)

MARRUFO-ESTRADA, D. M., SEGURA-CAMPOS, M. R., CHEL-GUERRERO, L. A., BETANCUR-ANCONA, D. A. Defatted *Jatropha curcas* flour and protein isolate as materials for protein hydrolysates with biological activity. **Food Chemistry**, v. 138, n. 1, p. 77–83, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.033>

MARTÍNEZ-ALVAREZ, O. 1. ed. **Marine Proteins and Peptides. Marine Proteins and Peptides: Biological Activities and Applications**. John Wiley & Sons, 2013. <https://doi.org/10.1002/9781118375082.ch2>

MIGUEL, M., CONTRERAS, M. M., RECIO, I., ALEIXANDRE, A. ACE-inhibitory and antihypertensive properties of a bovine casein hydrolysate. **Food Chemistry**, v. 112, n. 1, p. 211–214, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.05.041>

MILAN, Z., B., BOSKOVIC, M., IVANOVIC, J., JANJIC, J., DOKMANOVIC, M., MARKOVIC, R., TATJANA, B. Bioactive peptides from meat and their influence on human health. **Tehnologija Mesa**, v. 55, n. 1, p. 8–21, 2014.

MINE, Y., LI-CHAN, E., JIANG, B. 1. ed. **Bioactive Proteins and Peptides as Functional Foods and Nutraceuticals. Bioactive Proteins and Peptides as Functional Foods and Nutraceuticals**. John Wiley & Sons, 2010 <https://doi.org/10.1002/9780813811048>

MORAIS, H. A., SILVESTRE, M. P. C., SILVA, V. D. M., SILVA, M. R., SILVA, A. C. S., SILVEIRA, J. N. Correlation between the degree of hydrolysis and the peptide profile of whey protein concentrate hydrolysates: Effect of the enzyme type and reaction time. **American Journal of Food Technology**, v. 8, n. 1, p. 1–16, 2013. <https://doi.org/10.3923/ajft.2013.1.16>

NAJAFIAN, L., BABJI, A. S. A review of fish-derived antioxidant and antimicrobial peptides: Their production, assessment, and applications. **Peptides**, v. 33, n. 1, p. 178–185, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.11.013>

NAJAFIAN, LEILA, BABJI, A. S. Production of bioactive peptides using enzymatic hydrolysis and identification antioxidative peptides from patin (*Pangasius sutchi*) sarcoplasmic protein hydrolysate. **Journal of Functional Foods**, v. 9, n. 1, p. 280–289, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.05.003>

NASRI, R., AMOR, I. BEN, BOUGATEF, A., NEDJAR-ARROUME, N., DHULSTER, P., GARGOURI, J., CHÂABOUNI, M. K., NASRI, M. Anticoagulant activities of goby muscle protein hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 133, n. 3, p. 835–841, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.01.101>

NCHIENZIA, H. A., MORAWICKI, R. O., GADANG, V. P. Enzymatic hydrolysis of poultry meal with endo- and exopeptidases. **Poultry Science**, v. 89, p. 2273–2280, 2010. <https://doi.org/10.3382/ps.2008-00558>

NIU, H., ZHANG, M., XIA, X., LIU, Q., KONG, B. Effect of porcine plasma protein

hydrolysates on long-term retrogradation of corn starch. **Food Chemistry**, v. 239, p. 172–179, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.103>

NORRIS, R., FITZGERALD, R. J. **Antihypertensive Peptides from Food Proteins. Bioactive Food Peptides in Health and Disease**. InTech, 2013
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/51710>

NUTHONG, P., BENJAKUL, S., PRODPRAN, T. Characterization of porcine plasma protein-based films as affected by pretreatment and cross-linking agents. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 44, n. 2, p. 143–148, 2009.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2008.11.006>

OBOH, G., ADEMILUYI, A. O., FALOYE, Y. M. Effect of Combination on the Antioxidant and Inhibitory Properties of Tropical Pepper Varieties Against α -Amylase and α -Glucosidase Activities In Vitro. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, n. 10, p. 1152–1158, 2011.
<https://doi.org/10.1089/jmf.2010.0194>

OFORI, J. A.; HSIEH, Y.-H. P. The use of blood and derived products as food additives. In: **Food Additive**. IntechOpen. 2012.

OLIVEIRA, M. S. R. DE, FRANZEN, F. DE L., TERRA, N. N., KUBOTA, E. H. Utilização de enzimas proteolíticas para produção de hidrolisados proteicos a partir de carcaças de frango desossadas manualmente. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 18, n. 3, p. 199–210, 2015. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.4414>

OLUSANYA, R., JAMES, J., MIC-BRAIMOH, I. M., KORODE, E., NIKE, R., OSEMWEGIE, O. In vitro Angiotensin-1-converting enzyme, α -amylase and α -glucosidase inhibitory and antioxidant activities of Luffa cylindrical (L.) M. Roem seed protein hydrolysate. **Heliyon**, 5, e01634, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01634>

OLUSOLA, A. O., EKUN, O. E., DAVID, T. I., OLORUNFEMI, O. E., OYEWALE, M. B. Moringa oleifera Seed Protein Hydrolysates : Kinetics of α -amylase Inhibition and Antioxidant Potentials. **Journal of Medicine and Medical Sciences**, v. 7, n. 9, p. 190–201, 2018.

OSBORN, D., SINN, J., JONES, L. Infant formulas containing hydrolysed protein for prevention of allergy and food intolerance in infants (Review). **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 3, p. 1–164, 2017. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003664.pub3>

OSEGUERA-TOLEDO, M. E., GONZALEZ DE MEJIA, E., AMAYA-LLANO, S. L. Hard-to-cook bean (*Phaseolus vulgaris* L.) proteins hydrolyzed by alcalase and bromelain produced bioactive peptide fractions that inhibit targets of type-2 diabetes and oxidative stress. **Food Research International**, v. 76, p. 839–851, 2015.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.07.046>

OSMAN, A., GODA, H. A., ABDEL-HAMID, M., BADRAN, S. M., OTTE, J. Antibacterial peptides generated by Alcalase hydrolysis of goat whey. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 480–486, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.08.043>

OZUNA, C., PANIAGUA-MARTÍNEZ, I., CASTAÑO-TOSTADO, E., OZIMEK, L., AMAYA-LLANO, S. L. Innovative applications of high-intensity ultrasound in the development of functional food ingredients : Production of protein hydrolysates and bioactive peptides. **Food Research International**, v. 77, p. 685–696, 2015.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.10.015>

PACHECO, S. M. **Frutos da família Myrtaceae: Caracterização físico-química e potencial inibitório da atividade das enzimas digestivas**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, p. 1-82, 2015.

PEREIRA, L. L. S. **Inibidores de enzimas digestivas do feijão branco: isolamento, atividade biológica e perspectivas para o tratamento da obesidade e do diabetes mellitus**. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras. Lavras, p. 1-136, 2011.

PÉREZ-GÁLVEZ, R., ALMÉCIJA, M. C., ESPEJO, F. J., GUADIX, E. M., GUADIX, A. Bi-objective optimisation of the enzymatic hydrolysis of porcine blood protein. **Biochemical Engineering Journal**, v. 53, n. 3, p. 305–310, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2010.12.004>

PIERRO, G. DI, A. M. B. O., POYARKOV, A., LOMOLINO, G., FITZGERALD, R. J. Antioxidant activity of bovine casein hydrolysates produced by *Ficus carica* L.-derived proteinase. **Food Chemistry**, v. 156, p. 305–311, 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.080>

RAGHAVAN, S., KRISTINSSON, H. G. ACE-inhibitory activity of tilapia protein hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 117, n. 4, p. 582–588, 2009.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.04.058>

RAHMAN, U. UR, SAHAR, A., KHAN, M. A. Recovery and utilization of effluents from meat processing industries. **Food Research International**, v. 65, p. 322–328, 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.09.026>

RAMADHAN, A. H., NAWAS, T., ZHANG, X., PEMBE, W. M., XIA, W., XU, Y. Purification and identification of a novel antidiabetic peptide from Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*) protein hydrolysate against α -amylase and α -glucosidase. **International Journal of Food Properties**, v. 20, p. S3360–S3372, 2017.
<https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1354885>

RAO, M. B., TANKSALE, A. M., GHATGE, M. S., DESHPANDE, V. V. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 597–635, 1998.
<https://doi.org/papers2://publication/uuid/E58ABF6D-8C97-4209-810D-A452EE30B2CD>

REN, Y., WU, H., LAI, F., YANG, M., LI, X., TANG, Y. Isolation and identification of a novel anticoagulant peptide from enzymatic hydrolysates of scorpion (*Buthus martensii* Karsch) protein. **Food Research International**, v. 64, p. 931–938, 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.08.031>

ROUZBEHAN, S., MOEIN, S., HOMAEI, A., MOEIN, M. R. Kinetics of α -glucosidase inhibition by different fractions of three species of Labiatae extracts: a new diabetes treatment model. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p. 1483–1488, 2017.

<http://dx.doi.org/10.1080/13880209.2017.1306569>

RUI, X., BOYE, J. I., SIMPSON, B. K., PRASHER, S. O. Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides of small red bean (*Phaseolus vulgaris*) hydrolysates. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 3, p. 1116–1124, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.03.008>

RYAN, J. T., ROSS, R. P., BOLTON, D., FITZGERALD, G. F., STANTON, C. Bioactive peptides from muscle sources: Meat and fish. **Nutrients**, v. 3, n. 9, p. 765–791, 2011. <https://doi.org/10.3390/nu3090765>

SAADI, S., SAARI, N., ANWAR, F., ABDUL HAMID, A., GHAZALI, H. M. Recent advances in food biopeptides: Production, biological functionalities and therapeutic applications. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 1, p. 80–116, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.12.003>

SABOTIČ, J., KOS, J. Microbial and fungal protease inhibitors - Current and potential applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 4, p. 1351–1375, 2012. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3834-x>

SARMADI, B. H., ISMAIL, A. Peptides Antioxidative peptides from food proteins : A review. **Peptides**, v. 31, n. 10, p. 1949–1956, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.06.020>

SBROGGIO, M. F., MONTILHA, M. S., RIBEIRO, V., FIGUEIREDO, G. DE, GEORGETTI, S. R., KUROZAWA, L. E. 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. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.000216>

SEO, H. W., JUNG, E. Y., GO, G. W., KIM, G. D., JOO, S. T., YANG, H. S. Optimization of hydrolysis conditions for bovine plasma protein using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 185, p. 106–111, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.133>

SHAHIDI, F., ZHONG, Y. Bioactive Peptides. **Journal of AOAC International**, v. 91, n. 4, p. 914–931, 008.

SHAIKH, S., FATIMA, J., SHAKIL, S., RIZVI, S. M. D., KAMAL, M. A. Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 22, n. 1, p. 90–101, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.08.002>

SILVA, A. C. DA. **Atividade biológica de hidrolisados originados de proteínas da clara de ovos de galinha de capoeira**. Tese (Doutorado em Biociência Ambiental) - Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, p. 1-168, 2017.

SILVA, L. S. DA. **Inibição de acetilcolinesterase e a-amilase por extrato de Mouriri elliptica Martius**. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano. Rio Verde, p. 1-64, 2016.

SILVA, F. G. D. E., Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Netto, F. M., Miralles, B.

Identification of peptides released from flaxseed (*Linum usitatissimum*) protein by Alcalase® hydrolysis: Antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, v. 76, p. 140–146, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.10.049>

SOUZA, P. M., ALIAKBARIAN, B., XIMENES, E., FILHO, F., MAGALHÃES, P. O., JUNIOR, A. P., CONVERTI, A., PEREGO, P. Kinetic and thermodynamic studies of a novel acid protease from *Aspergillus foetidus*. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 81, p. 17–21, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.07.043>

SU, Y. Isolation and identification of pelteobagrin, a novel antimicrobial peptide from the skin mucus of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, v. 158, n. 2, p. 149–154, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2010.11.002>

SUN, Q., LUO, Y. Porcine hemoglobin hydrolysate prepared with pepsin: Antioxidant activities and their mechanisms. *International Journal of Food Properties*, v. 14, n. 4, p. 840–853, 2011. <https://doi.org/10.1080/10942910903453405>

SUN, Q., LUO, Y., SHEN, H., HU, X. Effects of pH, temperature and enzyme to substrate ratio on the antioxidant activity of porcine hemoglobin hydrolysate prepared with pepsin. *Journal of Food Biochemistry*, v. 35, n. 1, p. 44–61, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2010.00365.x>

SUN, Q., SHEN, H., LUO, Y. Antioxidant activity of hydrolysates and peptide fractions derived from porcine hemoglobin. *Journal of Food Science and Technology*, v. 48, n. 1, p. 53–60, 2011. <https://doi.org/10.1007/s13197-010-0115-0>

TAN, Y. N., AYOB, M. K., YAACOB, W. A. W. Purification and characterisation of antibacterial peptide-containing compound derived from palm kernel cake. *Food Chemistry*, v. 136, n. 1, p. 279–284, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.08.012>

TANZADEHPANAH, H., ASOODEH, A., MAHAKI, H., MOSTAJABODAVE, Z., CHAMANI, J., MOJALLAL-TABATABAEI, Z., EMTENANI, S., EMTENANI, S., MORADI, M. R. Bioactive and ACE binding properties of three synthetic peptides assessed by various spectroscopy techniques. *Process Biochemistry*, v. 51, n. 12, p. 2067–2075, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.09.017>

TANZADEHPANAH, H., ASOODEH, A., SABERI, M. R., CHAMANI, J. Identification of a novel angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptide from ostrich egg white and studying its interactions with the enzyme. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 18, p. 212–219, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2013.02.002>

TAVANO, O. L. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 90, p. 1–11, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.01.011>

TOLDRÃ, F., MORA, L., REIG, M. New insights into meat by-product utilization. *Meat Science*, v. 120, p. 54–59, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.04.021>

TREFFERS, C., CHEN, L., ANDERSON, R. C., YU, P. Isolation and characterisation of

antimicrobial peptides from deer neutrophils. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, p. 165–169, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2005.05.001>

TYBOR, P. T., DILL, C. W., LANDMANN, W. A. Functional properties of proteins isolated from bovine blood by a continuous pilot process. **Journal of Food Science**, v. 49, n. 5, p. 1327–1329, 1975. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1984.tb14981.x>

UDENIGWE, C. C., ALUKO, R. E. Food protein-derived bioactive peptides: Production, processing, and potential health benefits. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 1, p. R11–24 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02455.x>

UDENIGWE, C. C., HOWARD, A. Meat proteome as source of functional biopeptides. **Food Research International**, v. 54, n. 1, p. 1021–1032, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.10.002>

URAIPOG, C., ZHAO, J. Rice bran protein hydrolysates exhibit strong in vitro α -amylase, β -glucosidase and ACE-inhibition activities. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 4, p. 1101–1110, 2016. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7182>

VALDEZ-ORTIZ, A., FUENTES-GUTIÉRREZ, C. I., GERMÁN-BÁEZ, L. J., GUTIÉRREZ-DORADO, R., MEDINA-GODOY, S. Protein hydrolysates obtained from Azufrado (Sulphur yellow) beans (*Phaseolus vulgaris*): Nutritional, ACE-inhibitory and antioxidative characterization. **LWT - Food Science and Technology**, v. 46, n. 1, p. 91–96, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.10.021>

VERMA, A. K., CHATLI, M. K., KUMAR, P., MEHTA, N. Antioxidant and Antimicrobial Efficacy of Peptidic Hydrolysate Obtained from Porcine Blood. **Agricultural Research**, v. 8, n. 1, p. 116–124, 2019. <https://doi.org/10.1007/s40003-018-0350-6>

VERMEIRSEN, V., VAN CAMP, J., VERSTRAETE, W. Optimisation and validation of an angiotensin-converting enzyme inhibition assay for the screening of bioactive peptides. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 51, n. 1, p. 75–87, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0165-022X\(02\)00006-4](https://doi.org/10.1016/S0165-022X(02)00006-4)

VIDAL, A. R. **Avaliação das propriedades funcionais e estruturais de hidrolisados de diferentes colágenos bovinos obtidos por hidrólise enzimática assistida por ultrassom**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, p. 1-137, 2016.

VIEGAS, C. S. M. **Diabetes : análise in-vitro da atividade antioxidante e antidiabética de quatro extratos de plantas da região do Algarve**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade do Algarve. Faro, p. 1-91, 2017.

WEI, J., CHIANG, B. Bioactive peptide production by hydrolysis of porcine blood proteins in a continuous enzymatic membrane reactor. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 89, p. 372–378, 2009. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3451>

WESSELY-SZPONDER, J., MAJER-DZIEDZIC, B., SMOLIRA, A. Analysis of antimicrobial peptides from porcine neutrophils. **Journal of Microbiological Methods**, v. 83, n. 1, p. 8–12, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.07.010>

WHITAKE, J. R., DEKKE, M. Principles of Enzymology for the Food Sciences. **Trends in Food Science & Technology**, v. 5, p. 304–305, 1994.

WOJEICCHOWSKI, J. P., LIANDRA, G., SIQUEIRA, D. A. DE, LACERDA, L. G., SCHNITZLER, E., DEMIATE, I. M. Physicochemical , structural and thermal properties of oxidized , acetylated and dual - modified common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) starch. **Food Science and Technology**, v. 38, n. 2, p. 318–327, 2018.

WU, H., CHEN, H., SHIAU, C. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). **Food Research International**, v. 36, p. 949–957, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(03\)00104-2](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(03)00104-2)

XU, X., CAO, R., YANG, N. Antioxidant activity of hydrolysates derived from porcine plasma. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 89, p. 1897–1903, 2009. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3670>

ZAMBARE, V., NILEGAONKAR, S., KANEKAR, P. A novel extracellular protease from *Pseudomonas aeruginosa* MCM B-327: Enzyme production and its partial characterization. **New Biotechnology**, v. 28, n. 2, p. 173–181, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2010.10.002>

ZAMBROWICZ, A., POKORA, M., SETNER, B., DA, A., SZOŁTYSIK, M., BABIŁ, K., SZEWCZUK, Z., TRZISZKA, T., LUBEC, G., CHRZANOWSKA, J. Multifunctional peptides derived from an egg yolk protein hydrolysate : isolation and characterization. **Amino Acids**, v. 47, p. 369–380, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00726-014-1869-x>

ZHANG, S. B. In vitro antithrombotic activities of peanut protein hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 202, p. 1–8, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.108>