



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE
ALIMENTOS

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE PEPTÍDEOS PROVENIENTES DE
HIDROLISADO PROTEICO DE BIJUPIRÁ (*Rachycentron canadum*)
RENATA ALINE DOS SANTOS DA FONSECA

PROF. DR. CARLOS PRENTICE-HERNÁNDEZ
Orientador

RIO GRANDE, RS
2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE
ALIMENTOS

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE PEPTÍDEOS PROVENIENTES DE
HIDROLISADO PROTEICO DE BIJUPIRÁ (*Rachycentron canadum*)
RENATA ALINE DOS SANTOS DA FONSECA
Engenheira de Alimentos

Tese apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do título de Doutor em
Engenharia e Ciência de Alimentos.

Prof. Dr. CARLOS PRENTICE-HERNÁNDEZ
Orientador

RIO GRANDE – RS
2014

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Verena e Renato

Ao meu irmão Thiago

Ao meu sobrinho João Pedro

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Renato e Verena que me apoiaram, incentivaram e estiveram ao meu lado em qualquer circunstância. Obrigada pelo carinho, amor, confiança e amparo. Principalmente minha mãe que sempre esteve firme comigo em qualquer adversidade, pessoa mais companheira, altruísta, amorosa e dedicada que conheço, sem ela não conseguiria.

Ao meu irmão/amigo Thiago que me acompanhou, ajudou e incentivou se orgulhando dos meus passos. Obrigada por compartilhar tudo em minha vida sempre. E por me dar um sobrinho/afilhado João Pedro que chegou para iluminar minha vida.

Ao meu namorado Sebastián que me acompanhou e mesmo de longe sempre se fez presente, motivando-me com amor e paciência para que seguisse.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da FURG pelo aprendizado no exercício da docência, em especial: ao Professor Carlos pela orientação, apoio e por acreditar no meu potencial como pesquisadora.

Ao ICB-FURG pelo desenvolvimento das análises em célula animal, principalmente a Professora Dr^a. Ana Votto e as doutorandas Michele Carrett e Priscila Antiqueira.

Aos funcionários, técnicos e alunos da FURG pelos serviços e disposição em auxiliar, sobretudo a Técnica do LTA Sabrine, sempre disposta a colaborar além da sua função e a Dr^a. Michele, pessoa paciente e motivadora que é um diferencial no laboratório.

Aos meus “ajudantes” Adriane e Giordan, sem os quais o trabalho teria sido consideravelmente mais difícil.

Aos meus colegas/companheiros/amigos do laboratório de Tecnologia de Alimentos que me proporcionaram dias mais leves, tornaram as dificuldades mais amenas e me apoiaram em todos os momentos estressantes.

À Carolina e Ariane que além da amizade foram companheiras nas noites de trabalho, estando presentes nas análises mais longas e estressantes. À Inajara e Janise por sempre me motivarem. À Michelinha que se dispôs a me ajudar na formatação. Ao Dr. Fabiano por me auxiliar na trituração do pescado. Amigos que levarei no meu coração por toda vida.

Aos professores e alunos das Universidades de Rosário (UNR) e Santa Fé (UNL) na Argentina por me receberem tão bem e agregaram conhecimento na minha vida profissional.

Às pessoas especiais que me apoiaram, motivaram e contribuíram, direta ou indiretamente para execução deste trabalho e a continuar até o final desta jornada.

Aos ex-Presidente Lula e à Presidenta Dilma, CAPES, CNPq e Mincyt (Arg) pela concessão de bolsa de pós-graduação, apoio financeiro do projeto Bijupiráplus e intercâmbio.

Precisamos dar um sentido humano às nossas construções. E, quando o amor ao dinheiro, ao sucesso nos estiver deixando cegos, saibamos fazer pausas para olhar os lírios do campo e as aves do céu.

(Érico Veríssimo)

RESUMO

Algumas proteínas além das propriedades tecnológicas, funcionais e nutricionais apresentam atividade biológica, entre esta a antioxidante, associada a peptídeos bioativos liberados após hidrólise. Antioxidantes são utilizados em alimentos para retardar a peroxidação lipídica que gera compostos indesejáveis afetando a qualidade. Espécies reativas de oxigênio (ERO) presentes em organismos vivos podem danificar proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, levando ao desenvolvimento de várias doenças. Uma grande fonte de proteínas são os pescados, principalmente seus rejeitos do beneficiamento industrial, assim as proteínas do bijupirá (*Rachycentron canadum*), pescado de grande porte e facilmente adaptável ao cultivo em aquicultura, desponta como uma alternativa na obtenção de peptídeos com atividade antioxidante. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi obter peptídeos provenientes de hidrolisados proteicos do músculo e do resíduo do bijupirá com diferentes enzimas comerciais, ultrafiltrar em frações peptídicas, comparar o efeito antioxidante dos hidrolisados integrais e suas frações por métodos *in vitro*, avaliar a toxicidade e a inibição de ERO em células *in vivo* e aplicar os hidrolisados e frações peptídicas em sistemas alimentícios. Foram obtidos seis hidrolisados através da hidrólise do músculo e resíduo do bijupirá com Alcalase, Flavourzyme e Protamex, em que a última apresentou maior capacidade hidrolítica alcançando grau de hidrólise de 27,94% em 760 min para o músculo e 33,14% em 580 min para o resíduo. O teor de proteínas solúveis (tirosina) variou de acordo com substrato e enzima. A atividade antioxidante foi determinada através dos métodos do sequestro do DPPH, em que o músculo hidrolisado por Protamex apresentou maior efetividade (50 mg/mL) alcançando efeito sequestrante de 81,35%, seguido pelos hidrolisados de músculo e resíduo com Flavourzyme – 60,77 e 60,25%. O resíduo hidrolisado por Protamex apresentou-se como o mais promissor para o poder redutor e todos os hidrolisados apresentaram inibição da peroxidação lipídica do ácido linoleico por seis dias semelhante ou superior aos controles comerciais. A ultrafiltração forneceu frações de peptídeos maiores e menores que 3 kDa. As frações maiores que 3 kDa apresentaram maior quantidade de grupos sulfidríla, mas não foram capazes de sequestrar o DPPH, demonstraram maior potencial no poder redutor e aumentaram a inibição da peroxidação lipídica, chegando a mais de 80% frente ao branco. As frações menores que 3 kDa apresentaram capacidades menores ou semelhantes de sequestro do DPPH, poder redutor e na inibição da peroxidação do ácido linoleico quando comparados aos hidrolisados integrais. Foram selecionados os hidrolisados com Protamex (músculo e resíduo) menores que 3 kDa para avaliar seu efeito sobre células de hepatócitos de *zebrafish*, demonstrando não haver citotoxicidade nas concentrações estudadas (0,1 – 100 µg/mL), contudo não foram capazes de diminuir as ERO. A incorporação dos hidrolisados e suas frações em toucinho e carne bovina moída evidenciou que a maioria dos compostos reduziu o índice de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico alcançando mais de 80% frente ao branco. Portanto, através da hidrólise enzimática das proteínas do músculo e resíduo do bijupirá sob a atuação das enzimas Alcalase, Flavourzyme e Protamex foi possível obter hidrolisados e frações peptídicas antioxidantes com potencial para serem utilizados em alimentos.

PALAVRAS-CHAVE: atividade antioxidante, hidrólise enzimática, frações peptídicas, peroxidação lipídica, bijupirá.

ABSTRACT

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF PEPTIDES FROM THE HYDROLYZED PROTEIN

COBIA (*Rachycentron canadum*)

Some proteins, in addition to their technological, functional and nutritional properties, present biological activity, being one of them, the antioxidant activity, associated to bioactive peptides released after the hydrolysis. The antioxidants are used in foods to slow the lipid peroxidation that generates undesirable compounds, affecting the quality. Reactive oxygen species (ROS) present in organisms can damage proteins, lipids and nucleic acids, leading to the development of various diseases. A great source of proteins is the fish, specially their industrial processing wastes. Therefore, the proteins from the cobia (*Rachycentron canadum*), a large fish that is easily adaptable to cultivation in aquaculture, emerges as an option to obtain peptides with antioxidant activity. Thus, the aim of this study was to obtain peptides from protein hydrolysates from the muscles and residues of cobia with different enzymes, ultrafiltrate in peptide fractions, compare the antioxidant effect between the whole hydrolysates and their peptides fractions using *in vitro* methods, measure the toxicity and the ROS inhibition *in vivo* cells and apply both hydrolysates and peptide fractions in food matrix. Six hydrolysates were obtained through the hydrolysis of the muscles and residues of the cobia with Alcalase, Flavourzyme and Protamex, wherein the last one presented greater hydrolytic capacity for the substrates, reaching a degree of hydrolysis of 27.94% in 760 min for the muscle and 33.14% in 580 min for the residue. The content of soluble protein (tyrosine) varied depending on the substrate and the enzyme. The antioxidant activity was determined through the DPPH free radical scavenging assay, in which the muscle with Protamex showed itself more effective (50 mg/ml) reaching 81.35%, followed by the muscle and the residue with Flavourzyme – 60.77 and 60.25%. The residue, also hydrolyzed by Protamex, showed the best effect in the reducing power and, in the 6 days lipid peroxidation of the linoleic acid, in which all the hydrolysates presented the same or higher inhibition compared to the commercial controls. The ultrafiltration provided larger and smaller than 3 kDa fractions. The larger than 3 kDa fractions showed a higher amount of sulfhydryl groups, but were not capable to sequester the DPPH, also showed higher potential in the reducing power and increased the inhibition of the lipid peroxidation, achieving more than 80% comparing to the blank. The smaller than 3 kDa fractions results were similar or smaller in the DPPH sequestering, in the reducing power and in the lipid peroxidation of the linoleic acid when compared to the whole hydrolysates. Smaller than 3 kDa hydrolysates (muscle and residue) with Protamex were selected to measure its effect over zebrafish hepatocyte cells, demonstrating no cytotoxicity with the studied concentrations (0.1 - 100 µg/ml), however they were not capable to reduce the ROS. The incorporation of the hydrolysates and its fractions in bacon and ground beef showed that most of the composites reduced the tiobarbituric acid reactive substances index, achieving more than 80% in comparison to the blank. Therefore, through the enzymatic hydrolysis of proteins from muscles and residues of cobia, under the action of Alcalase, Flavourzyme and Protamex, it was possible to obtain antioxidant hydrolysates and peptide fractions with potential to be used in foods.

KEYWORDS: antioxidant activity, enzymatic hydrolysis, peptide fractions, lipid peroxidation, cobia.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição proximal do músculo e resíduo de bijupirá utilizado para hidrólise. 58

Tabela 2 – Percentual de proteína solúvel em tirosina dos hidrolisados proteicos do músculo e resíduo do bijupirá pelas enzimas Alcalase, Flavourzyme e Protamex. 65

Tabela 3 – Teor de grupos sulfidrila dos hidrolisados de músculo e resíduo do bijupirá pelas enzimas Alcalase, Flavourzyme e Protamex, integrais e frações peptídicas maiores e menores que 3 kDa. 70

Tabela 4 – Diferença de peroxidação lipídica entre o último e primeiro dia e porcentagem de inibição com relação ao branco para músculo e resíduo de bijupirá hidrolisados por Alcalase, Flavourzyme e Protamex, integrais e nas frações peptídicas maiores e menores que 3 kDa. . 80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Bijupirá (<i>Rachycentron canadum</i>).....	24
Figura 2 – Mecanismo de peroxidação lipídica – Esquema geral.....	34
Figura 3 – Mecanismo de ação para os antioxidantes primários.....	35
Figura 4 – Reação do teste de TBA entre o ácido 2-tiobarbitúrico e o malonaldeído, formando o composto colorido, medido espectrofotometricamente a 532 nm.	41
Figura 5 – Formas radicalar α,α -difeníl- β -picrilidrazil (a) e não radicalar/reduzida α,α -difeníl- β -picrilidrazina (b) do DPPH.....	42
Figura 6 – Algumas reações do sistema de defesa antioxidante em uma célula.	45
Figura 7 – Fluxograma do processo de obtenção dos hidrolisados proteicos.	50
Figura 8 – Perfil de separação de proteínas por eletroforese. (a) resíduo; (b) padrão; (c) músculo.....	59
Figura 9 – Cinética do grau de hidrólise de músculo de bijupirá utilizando as enzimas Alcalase, Flavourzyme e Protamex.	60
Figura 10 – Cinética do grau de hidrólise de resíduo de bijupirá utilizando as enzimas Alcalase, Flavourzyme e Protamex.	61
Figura 11 – Cinética da ultrafiltração para os hidrolisados de músculo e resíduo do bijupirá pelas enzimas Alcalase, Flavourzyme e Protamex.....	68
Figura 12 – Efeito sequestrante de DPPH relativo ao branco dos hidrolisados de músculo e resíduo de bijupirá com Alcalase, Flavourzyme e Protamex integrais.....	73
Figura 13 – Efeito sequestrante de DPPH relativo ao branco dos hidrolisados de músculo e resíduo de bijupirá com Alcalase, Flavourzyme e Protamex nas frações peptídicas maiores que 3 kDa.....	73
Figura 14 – Efeito sequestrante de DPPH relativo ao branco dos hidrolisados de músculo e resíduo de bijupirá com Alcalase, Flavourzyme e Protamex nas frações peptídicas menores que 3 kDa.....	74
Figura 15 – Poder redutor dos hidrolisados de músculo e resíduo de bijupirá com Alcalase, Flavourzyme e Protamex integrais.	77
Figura 16 – Poder redutor dos hidrolisados de músculo e resíduo de bijupirá com Alcalase, Flavourzyme e Protamex nas frações peptídicas maiores que 3 kDa.....	77
Figura 17 – Poder redutor dos hidrolisados de músculo e resíduo de bijupirá com Alcalase, Flavourzyme e Protamex nas frações peptídicas menores que 3 kDa.	78

Figura 18 – Efeito do hidrolisado proteico de músculo de bijupirá com Protamex menor que 3 kDa na viabilidade celular através do teste do MTT em dois momentos distintos (a e b). ..	83
Figura 19 – Efeito do hidrolisado proteico de resíduo de bijupirá com Protamex menor que 3 kDa na viabilidade celular através do teste do MTT em dois momentos distintos (a e b).	84
Figura 20 – Efeito do hidrolisado proteico do músculo e resíduo do bijupirá com Protamex menores que 3 kDa em duas concentrações (1 e 10 µg/mL) nas espécies reativas ao oxigênio intracelular/viabilidade em células de hepatócitos de <i>zebrafish</i>	85
Figura 21 – Efeito dos hidrolisados de músculo e resíduo de bijupirá com Alcalase, Flavourzyme e Protamex integrais na formação de TBARS em alimentos.....	87
Figura 22 – Efeito dos hidrolisados de músculo e resíduo de bijupirá com Alcalase, Flavourzyme e Protamex nas frações peptídicas maiores que 3 kDa na formação de TBARS em alimentos.	87
Figura 23 – Efeito dos hidrolisados de músculo e resíduo de bijupirá com Alcalase, Flavourzyme e Protamex nas frações peptídicas menores que 3 kDa na formação de TBARS em alimentos.	88

LISTA DE ABREVIATURAS

- A• – radical inerte
- Abs – absorvância
- AH – antioxidante com um átomo de hidrogênio ativo
- Ala – alanina
- AOAC - Association of Official Analytical Chemists
- Arg – arginina
- Asn – asparagina
- Asp – ácido aspártico
- B – ausência de potencial antioxidante
- B – volume da base consumida na hidrólise para manter o pH constante (mL)
- B.S. – base seca
- B.U. – base úmida
- B0 – ausência de potencial antioxidante no tempo zero
- BHA – hidroxianisol de butila
- BHT – hidroxitolueno de butila
- CEME-SUL – Centro de Microscopia Eletrônica da Região Sul
- DMSO – dimetilsulfóxido
- DNA – ácido desoxirribonucléico
- DPPH – 1,1-difenil-2-picrilidrazil
- E. C. – Enzyme Commission Number (ingles) - NC-IUBMB
- EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético
- ERO – Espécies Reativas de Oxigênio
- ES – efeito sequestrante
- ESI-MS, ESI-MS/MS – Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry
- FAO – Food and Agriculture Organization
- FPH – Fish Protein Hydrolysated (inglês)
- FURG – Universidade Federal do Rio Grande
- GH – grau de hidrólise
- Gln – glutamina
- Glu – ácido glutâmico
- Gly – glicina
- H2DCF-DA – diacetato de 2',7'diclorofluoresceína

His – histidina

HPP – Hidrolisado Proteico de Pescado

h_{tot} – número de ligações peptídicas (moles equiv/kg)

Hyp – hidroxiprolina

Leu – leucina

LTA – Laboratório de Tecnologia de Alimentos

m/m – massa/massa

m/v – massa/volume

MA – hidrolisado do músculo com Alcalase

MDA – malonaldeído

MEV – microscopia eletrônica de varredura

MF – hidrolisado do músculo com Flavourzyme

MM – massa molar

MP – hidrolisado do músculo com Protamex

mP – massa de proteína (g, determinado em N x fator de Kjeldahl)

MTT – brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio

N – nitrogênio

NaOH – hidróxido de sódio

N_B – normalidade da base

NC-IUBMB – Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry
and Molecular Biology

NF – nanofiltração

n° – número

P.A. – padrão analítico

PBS – solução tampão de fosfato padrão

pH – potencial hidrogeniônico

Phe – fenilalanina

pK – constante de dissociação

ppm – partes por milhão

ppt – partes por trilhão

Pro – prolina

R^\bullet – radical

RA – hidrolisado do resíduo com Alcalase

RF – hidrolisado do resíduo com Flavourzyme

RH – ácido graxo insaturado
ROO• – radical peróxido
ROOH – hidroperóxido
RP – hidrolisado do resíduo com Protamex
SDS – dodecil sulfato de sódio
Ser – serina
SH – sulfidrina
T – temperatura
TBARS – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA – ácido tricloroacético
TEP – 1,1,3,3-tetraetoxipropano
TMP – 1,1,3,3-tetrametoxipropano
Trp – triptofano
Tyr – tirosina
UF – ultrafiltração
UPP – Unidade de Processamento de Pescado
v/v – volume/volume
Val – valina
 α – grau de dissociação

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	OBJETIVOS	21
2.1	Geral.....	21
2.2	Específicos	21
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
3.1	Pescado	22
3.1.1	Bijupirá (<i>Rachycentron canadum</i>).....	23
3.1.2	Proteínas de pescado	24
3.2	Hidrólise enzimática	26
3.3	Alimentos funcionais e substâncias bioativas.....	30
3.4	Antioxidantes	30
3.4.1	Mecanismo de ação e classificação	32
3.4.2	Peptídeos antioxidantes.....	35
3.4.3	Métodos de determinação da atividade antioxidante	39
3.4.4	Métodos <i>in vitro</i>	39
3.4.5	Métodos <i>in vivo</i>	43
4	MATERIAL E MÉTODOS	47
4.1	Material	47
4.1.1	Matéria prima e reagentes.....	47
4.1.2	Infraestrutura.....	47
4.2	Métodos	48
4.2.1	Caracterização da matéria prima.....	48
4.2.2	Obtenção dos hidrolisados proteicos de bijupirá	49
4.2.3	Determinação do grau de hidrólise (GH).....	50
4.2.4	Determinação de proteínas solúveis expressas em tirosina	51
4.2.5	Fracionamento dos hidrolisados proteicos utilizando ultrafiltração (UF)	51
4.2.6	Determinação dos grupos sulfidril de hidrolisados e das frações peptídicas	52
4.2.7	Medida da atividade antioxidante dos hidrolisados e frações peptídicas	53
4.2.7.1	Sequestro do radical DPPH•	53
4.2.7.2	Poder redutor.....	53
4.2.7.3	Sistema modelo do ácido linoleico	54
4.2.7.4	Técnica <i>in vivo</i> em células animais.....	54

4.2.8	Aplicação dos hidrolisados e frações peptídicas em alimentos.....	55
4.2.9	Análise estatística.....	56
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1	Caracterização da matéria prima	57
5.2	Obtenção dos hidrolisados proteicos de pescado	60
5.3	Teor de proteína solúvel medida em tirosina	64
5.4	Obtenção das frações peptídicas dos hidrolisados	67
5.5	Determinação de grupos sulfidrilas	69
5.6	Determinação da atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos.....	72
5.6.1	Sequestro do radical DPPH•.....	72
5.6.2	Poder Redutor.....	76
5.6.3	Peroxidação lipídica do ácido linoleico.....	80
5.6.4	Ensaio com células animais.....	83
5.7	Aplicação dos hidrolisados e frações peptídicas em alimentos.....	86
6	CONCLUSÃO.....	92
7	PERSPECTIVAS	94
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
	APÊNDICE 1	114
	APÊNDICE 2	115
	APÊNDICE 3	116
	APÊNDICE 4	117
	APÊNDICE 5	118
	APÊNDICE 6	119
	APÊNDICE 7	121
	APÊNDICE 8	123
	APÊNDICE 9	125
	APÊNDICE 10	126
	ANEXO 1	128

1 INTRODUÇÃO

Dos estimados 140 milhões de toneladas de pescado produzidos a cada ano no mundo, apenas uma parte é utilizada para consumo humano direto. O restante inclui carcaças, ossos, pele, órgãos intestinais e também uma grande quantidade de pescado comestível, que representa até mais de 50% do total das capturas, e é descartado como resíduo do processamento ou subproduto. Estes subprodutos são muitas vezes rejeitados ou utilizados sem tratamento para a alimentação animal (farinha) ou como fertilizante. No entanto, o reconhecimento da limitação de recursos biológicos, o declínio mundial das populações de peixes e o aumento da poluição ambiental tem ressaltado a necessidade de uma melhor utilização das capturas suplementares e dos subprodutos da pesca (FAO, 2008; GUÉRARD et al., 2010; JE; KIM; KIM, 2005; JE et al., 2009).

O aproveitamento de resíduos no ciclo de processamento de pescado brasileiro é pouco significativo. Frigoríficos processadores de pescado desperdiçam entre 62,5 e 66,5% (BOSCOLO; HAYASH; MEURER, 2004). Em contrapartida, as indústrias mundiais de beneficiamento de carnes processam aproximadamente 60 milhões de toneladas por ano de subprodutos animais, que após sofrerem elaborados processos, podem ser reaproveitados como ingredientes de alta qualidade, sendo uma importante forma de redução de custos e uma alternativa excelente para a preservação do meio ambiente (BRITO, 2007).

O bijupirá (*Rachycentron canadum*) é um peixe que apresenta rápida taxa de crescimento (HASSLER; RAINVILLE, 1975) e se adapta bem ao confinamento aceitando rações formuladas (SCHWARZ, 2004). Sua carne é considerada um alimento de qualidade excelente, de alto apelo ao consumidor (OESTERLING, 2001). Estas características, juntamente com o sucesso da expansão da aquicultura de bijupirá em diversos países, têm estimulado sua produção, bem como o seu uso em indústrias processadoras de pescado (BENETTI et al., 2007; LIAO et al., 2004; WEIRICH et al., 2010). Este contribui para o desenvolvimento de destinos e técnicas alternativas para aproveitamento dos seus subprodutos.

A obtenção de ingredientes ativos provenientes de hidrolisados de subprodutos de pescado tem sido um grande anseio do setor da biotecnologia marinha; esses produtos são reduzidos em termos de volume, mas com alto valor comercial, e existe um enorme potencial para essas moléculas inovadoras (THORKELSSON; KRISTINSSON, 2009)

De fato, processos enzimáticos aplicados para a recuperação de proteínas de pescado tornam possível produzir um grande e diversificada gama de produtos para diferentes

aplicações (GUÉRARD et al., 2007). Estudos recentes revelaram uma ampla gama de aplicações dos hidrolisados proteicos de pescado (HPP), como novas fontes de peptídeos bioativos relacionados com o sistema imunológico, opiáceos, antioxidante, anti-hipertensivo, entre outros (CENTENARO, 2011; GUÉRARD et al., 2010; SILVA, 2014).

Sugere-se que frações peptídicas de proteínas antioxidantes podem ser utilizadas como aditivos alimentares, nutrientes da dieta e fármacos como uma alternativa aos comumente antioxidantes sintéticos usados, como o hidroxianisol de butila (BHA) e o hidroxitolueno de butila (BHT) que têm sido limitados em suas aplicações como aditivos alimentares por causa de riscos potenciais à saúde. Dessa maneira, as últimas décadas apresentam um crescente interesse em encontrar antioxidantes seguros e naturais para aumentar as defesas do organismo através de suplementos alimentares, além de inibir a oxidação lipídica em alimentos (LI et al., 2007, 2008).

No entanto, mais estudos detalhados sobre frações peptídicas que relacionam atividade antioxidante com a massa molecular, a sequência de aminoácidos e o mecanismo de atuação são necessários (JE et al., 2007), já que pouco é conhecido sobre sua estrutura, conforme demonstram os resultados obtidos em pesquisas recentes corroborando com esta hipótese (BOUGATEF et al., 2010; DONG et al., 2008; JE et al., 2007, 2009; JE; KIM; KIM, 2005; JE; PARK; KIM, 2005; JUN et al., 2004; LI et al., 2007). Assim, a separação por membranas, como ultrafiltração (UF) e nanofiltração (NF) podem ser utilizadas após a hidrólise, aumentando as atividades específicas dos HPP (BORSEAU et al., 2009) e reduzindo a utilização das técnicas cromatográficas.

Somando-se a estes estudos, a implementação de técnicas *in vivo* se apresenta como uma forma de analisar a capacidade antioxidante através de outro mecanismo auxiliando na elucidação desta bioatividade. Assim, as células animais de hepatócitos de *zebrafish* despontam como um modelo já estabelecido na literatura que fornece resultados elucidativos (HILGEMANN, 2010; SANDRINI et al., 2009).

Neste sentido, este trabalho objetivou a utilização de proteínas de músculo e resíduos do bijupirá (*Rachycentron canadum*) hidrolisados enzimaticamente e fracionados por ultrafiltração, para obtenção e caracterização de peptídeos com atividade antioxidante.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Obter peptídeos com atividade antioxidante provenientes de hidrolisados proteicos de bijupirá (*Rachycentron canadum*).

2.2 Específicos

- ✓ Obter hidrolisados proteicos do músculo e do resíduo do bijupirá;
- ✓ Avaliar o comportamento do processo de hidrólise a partir da atuação das enzimas comerciais Alcalase, Flavourzyme e Protamex sobre o músculo e resíduo do bijupirá;
- ✓ Fracionar em diferentes faixas de tamanho de massa molar os peptídeos presentes nos hidrolisados por ultrafiltração;
- ✓ Quantificar e comparar o efeito antioxidante dos hidrolisados integrais e das frações peptídicas obtidas utilizando métodos *in vitro*;
- ✓ Avaliar a toxicidade e o potencial antioxidante das frações peptídicas menores que 3 kDa dos hidrolisados de músculo e resíduo do bijupirá por Protamex em células *in vivo*;
- ✓ Aplicar os hidrolisados e frações peptídicas em alimentos cárneos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Pescado

A importância nutricional do pescado está baseada no seu conteúdo de proteínas de alto valor biológico, alta digestibilidade, vitaminas, especialmente A e D, e a na qualidade da fração lipídica, rica em ácidos graxos insaturados e baixos teores de colesterol (SALÁN; GALVÃO; OETTERER, 2006).

De acordo com a FAO (2007), o consumo médio mundial de pescado (kg/per capita/ano), carnes de frango e bovina são de 16,69, 12,62 e 9,59, respectivamente sendo o consumo de carne total de 40,09 kg/per capita/ano. Em contrapartida, no Brasil, de um total de 80,49 kg/per capita/ano de carne consumida, 37,16 e 31,66 kg/per capita/ano são de carne bovina e de frango, nesta ordem, enquanto que apenas 6,87 kg/per capita/ano são de pescado. Este índice ainda é mais reduzido quando comparado com países como Espanha, onde o consumo pode chegar até 40 kg/per capita/ano.

No entanto, segundo dados do Ministério da Pesca e Aquicultura (BRASIL, 2010, 2013), o consumo de pescado vem crescendo. Houve um aumento de 7,9% entre 2009 e 2010 e, em 2011 nada menos do que 14,5% a mais do que em relação ao ano anterior alcançando a média por habitante ano no País de 11,17 kg, valor ainda abaixo do mínimo recomendado pela Organização Mundial de Saúde, que é de 12 kg por habitante por ano (FAO, 2012). Em dois anos (2010 e 2011) o crescimento da demanda por peixes e frutos do mar aumentou em média 23,7%.

Baseado em estatísticas, estima-se que anualmente uma média de 7,3 milhões de toneladas de pescado capturado são descartadas (KELLEHER, 2005; FAO, 2007), enquanto que industrialmente, com o processamento, o descarte anual é estimado em cerca de 20 milhões de toneladas, considerando que seja 25% da produção total (RUSTAD, 2003).

Acreditava-se que o pescado era uma fonte de alimento inesgotável, com seus subprodutos resultantes do processamento vistos como um rejeito inútil e descartado sem uma tentativa de recuperação (BHASKAR; MAHENDRAKAR, 2008). Porém, devido à captura de pescado ter diminuído nos últimos anos, pela pesca mais seletiva, à estrita regulamentação e ao colapso de algumas espécies, aparece como de suma importância o reaproveitamento dos rejeitos e a produção de pescado através de aquicultura, que vem ganhando um espaço significativo alcançando 52,5 milhões de toneladas, representando 36,93% do total de

pescado, existindo ainda necessidade e muitas oportunidades de reduzir as perdas durante o seu processamento (FAO, 2008; KELLEHER, 2005).

Em 2009 o Brasil alcançou uma produção de 1.240.765 toneladas de pescado, o que correspondeu a 0,85% do total produzido mundialmente (146 milhões de toneladas) e, em 2010, foi de 1.264.765 toneladas, registrando-se um incremento de 2% em relação ao ano anterior. A pesca extrativa marinha continuou sendo a principal fonte de produção de pescado nacional, sendo responsável por 536.455 toneladas (42,4% do total de pescado), seguida, sucessivamente, pela aquicultura continental com 394.340 toneladas (31,2%), pesca extrativa continental com 248.911 toneladas (19,7%) e aquicultura marinha com 85.057 toneladas (6,7%). O Rio Grande do Sul apresentou um incremento na produção de pescado em 2010 em relação ao ano de 2009, com um crescimento de 24,5% (BRASIL, 2010; FAO, 2012).

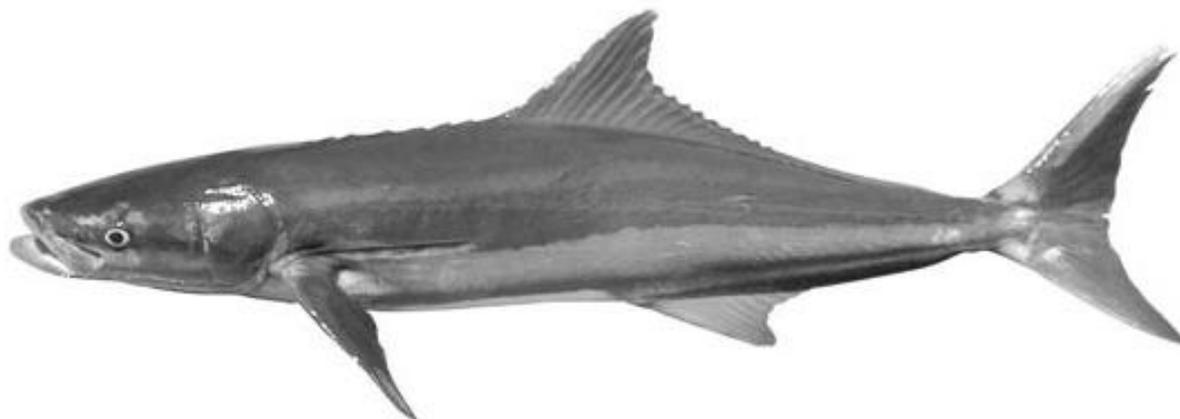
Em 2010 foi registrada uma redução de 8,4% na produção de pescado oriunda da pesca extrativa marinha em relação a 2009, por outro lado, a produção da pesca extrativa continental e a aquicultura continental e marinha fecharam em alta em relação a 2009, com um acréscimo de 3,9%, 16,9% e 9%, respectivamente (BRASIL, 2010). O total da aquicultura em 2010 chegou a 499.799 de toneladas já em 2012 foi de 611.343 de toneladas (FAO, 2012, 2014), evidenciando a importância do investimento em aquicultura.

3.1.1 Bijupirá (*Rachycentron canadum*)

O bijupirá, também conhecido como beijupirá, cobia, parambijú ou cação de escamas, é o único membro da família Rachycentridae. É uma espécie pelágica e migratória que é amplamente distribuída nas águas tropicais e subtropicais de todos os continentes exceto na porção leste do Pacífico, entre as latitudes 32 °N e 28 °S (CHOU; SU; CHEN, 2001). Segundo Figueiredo e Menezes (2000) e Sanches et al. (2008), o bijupirá habita toda a costa brasileira em áreas costeiras e alto-mar, podendo ser encontrada, ocasionalmente, em águas rasas com fundo rochoso ou de recife, assim como em estuários e baías.

Trata-se de uma espécie de grande porte, corpo alongado e subcilíndrico com cabeça grande e achatada podendo atingir até 60 kg e mais de 2 m de comprimento. Possui escamas pequenas, coloração marrom escuro, ventre amarelado e apresenta duas faixas prateadas ao longo do corpo como ilustrado na Figura 1 (FIGUEIREDO; MENEZES, 2000; SANCHES et al., 2008).

Figura 1 – Bijupirá (*Rachycentron canadum*).



Fonte: Department of Agriculture, Fisheries and Forestry (2014).

Esta espécie possui hábitos alimentares carnívoros e, expressa características de produção relevantes, tais como: a facilidade de reprodução em cativeiro, tolerância a largas faixas de temperatura (16,8-32,2 °C) e salinidade (5-44,5 ppt), assim como elevada taxa de crescimento durante os períodos larval e juvenil atingindo até 6 kg em 8 a 12 meses e até 15 kg em 24 meses (BENETTI, et al., 2010; CHOU; SU; CHEN, 2001; FAULK; HOLT, 2008). De acordo com os indicadores econômicos avaliados por Sanches et al. (2008), o cultivo de bijupirá em tanques-rede em sistema *offshore* demonstram sua viabilidade destinada aos grandes empreendedores, consistindo em uma atraente atividade econômica quando se considera o potencial de produção das espécies marinhas.

Comparado ao salmão, possui produtividade até quatro vezes maior e com possibilidades de mercado superiores, pois a demanda mundial por pescados de carne branca de alta qualidade é promissora, principalmente para animais que produzem filés acima de 1 kg adequados ao consumo na forma de *sashimi* (CHOU; SU; CHEN, 2001; CRAIG, SCHWARZ; McLEAN, 2006; FAULK; HOLT, 2008; KAISER; HOLT, 2005). Sua carne é rica em proteínas e possui elevados níveis de ácidos graxos altamente insaturados, em especial os ácidos eicosapentaenóico e docosahexaenóico, além de vitamina E, taurina e ornitina (CHANG, 2003).

3.1.2 Proteínas de pescado

As proteínas constituem a maioria das substâncias nitrogenadas e são consideradas os componentes mais importantes em alimentos, superadas somente pela água e pela gordura, em

alguns casos. Quimicamente são polímeros de alta massa molar, cujas unidades básicas são os aminoácidos ligados entre si por ligações peptídicas formando longas cadeias, em várias estruturas geométricas e combinações químicas para formar as proteínas específicas cada qual com sua atividade fisiológica. Todas as proteínas são compostas de aproximadamente 20 aminoácidos, sendo que a proporção dos mesmos varia conforme a característica da fonte de proteína (BOBBIO; BOBBIO, 2003; SGARBIERI, 1996).

Proteínas são componentes essenciais a todas as células vivas e estão relacionadas com todas as funções biológicas. Embora os vegetais sejam capazes de sintetizar proteínas a partir de fontes inorgânicas de nitrogênio, os animais não possuem esta capacidade, necessitando de alimentos ricos em proteínas e aminoácidos (BOBBIO; BOBBIO, 2003).

As proteínas da carne estão divididas de acordo com a sua característica histológica, função e solubilidade: as proteínas miofibrilares, também chamadas citoesqueléticas, solúveis em solução salina concentrada, representadas pela miosina, tropomiosina, actina e troponina possuem função de contração muscular e locomoção dos animais; as proteínas sarcoplasmáticas, solúveis em água ou soluções salinas, compreendendo a globulina, mioglobina e hemoglobina e as proteínas estromáticas, insolúveis do tecido conjuntivo, que são o colágeno, a elastina e a reticulina, (PARDI et al., 1995), são responsáveis pela estruturação do músculo, o colágeno, principal componente da proteína (20-25%) (BRUCE et al., 2001) sob ação do calor é capaz de se gelatinizar sendo esta uma característica extremamente importante nos processos que envolvem o cozimento de produtos alimentícios (BAILEY; LIGHT, 1989).

Geralmente, as proteínas de origem animal apresentam melhor equilíbrio de seus aminoácidos indispensáveis e um maior índice de digestibilidade do que as de origem vegetal (SGARBIERI, 1996).

O músculo de pescado, rico em proteínas de elevado valor biológico, apresenta em torno de 15 a 25%, considerando a variação entre espécies, assim como, um balanceamento em aminoácidos essenciais, comparáveis à proteína padrão, fornecendo um valor biológico próximo de 100. Além do seu alto teor de lisina, um aminoácido limitante em cereais como arroz, milho e farinha de trigo, podendo, então, complementar a dieta. A digestibilidade é alta, acima de 95%, conforme a espécie, e maior do que nas carnes em geral e no leite. Com o processamento, como o congelamento a qualidade protéica do pescado é mantida, no entanto um descongelamento errôneo pode levar à extração de parte das proteínas. A indústria é capaz de concentrar as proteínas do pescado e produzir os concentrados proteicos com teor de até 95% (OETTERER, 1996; TONIAL et al., 2010).

A indústria se utiliza das propriedades funcionais das proteínas do pescado para produzir novos alimentos, como é o caso do surimi, do kamaboko e dos análogos; tecnologias emergentes no mercado do ocidente, porém seculares no oriente. Ainda, a extração do colágeno permite aproveitar resíduos para obtenção de gelatina industrial. Para a indústria de rações o preparo de farinhas, onde há a concentração da fração protéica, já é feito em todo o mundo e hoje vem sendo substituída pela silagem, processo menos oneroso e que leva à maior digestibilidade das proteínas do pescado, podendo ser feito por vias química, enzimática e microbiana. Conforme o tipo de resíduo é possível produzir fertilizante marinho. Já os concentrados proteicos e/ou hidrolisados se destinam a fins especiais como a alimentação humana e obtenção de peptona para meios de cultura, ou ainda à alimentação de larvas de alevinos em tanques de piscicultura (OETTERER, 1996).

3.2 Hidrólise enzimática

As proteínas podem ser modificadas intencionalmente por reações químicas, enzimáticas, transformações físicas ou alterações genéticas. As técnicas que envolvem modificações químicas das proteínas têm dado lugar aos métodos enzimáticos, pelo fato da hidrólise química, ácida e/ou alcalina, ser inespecífica e ocasionalmente destruir aminoácidos como o triptofano, o que poderia comprometer o valor nutricional da proteína. Essas modificações podem ocorrer *in vivo* ou *in vitro* (SGARBIERI, 1996).

Segundo Panyam e Kilara (1996), a hidrólise enzimática da proteína resulta em: a) diminuição da massa molar, b) aumento do número de grupos ionizáveis, c) exposição de grupos hidrofóbicos que estavam protegidos na estrutura original da proteína. A hidrólise altera a conformação da proteína, quebrando as ligações peptídicas e produzindo peptídeos de cadeia curta, aumentando a disponibilidade de sítios polares, concorrendo para uma maior absorção de água. Uma das principais consequências da hidrólise enzimática é o aumento da solubilidade e, normalmente este aumento está associado ao aumento do grau de hidrólise (GH). O aumento da solubilidade dos hidrolisados é provavelmente devido à diminuição do tamanho das moléculas e o correspondente aumento da exposição de grupos hidrofílicos amino e carboxil ionizáveis, peptídeos maiores promovem maior estabilidade da emulsão, ao passo que a presença de peptídeos menores prejudica a estabilidade. A hidrólise extensiva das proteínas resulta em uma drástica perda das propriedades emulsificantes e a atividade emulsificante da diminui linearmente com o GH.

A definição para os hidrolisados proteicos indica que são proteínas clivadas química ou enzimaticamente em peptídeos de vários tamanhos, que podem ser utilizados em ampla variedade de produtos alimentícios, incluindo substitutos de leite, suplementos proteicos (fórmulas hipoalergênicas e alimentação enteral), realçadores de sabor e estabilizadores em bebidas, dentre outros. A hidrólise química é mais comumente utilizada na prática industrial, mas pode danificar os L-aminoácidos, produzindo D-aminoácidos e ainda formar substâncias tóxicas como a lisino-alanina, o que limita o seu uso para a alimentação devido à importância das proporções de aminoácidos, dipeptídeos e tripeptídeos na absorção pelo organismo. Porém, os processos biológicos que utilizam adição de enzimas são mais promissores quando se deseja produtos com alta funcionalidade e valor nutritivo. Dessa forma, é possível produzir hidrolisados com perfil de peptídeos bem definido, ao contrário da hidrólise ácida e alcalina (LAHL; BRAUN, 1994; MARTINS; COSTA; PRENTICE, 2009).

As enzimas de origem microbiana em comparação com as de animais ou as derivadas de plantas oferecem várias vantagens, incluindo uma ampla variedade de atividades catalíticas, e são estáveis em maiores faixas de pH e de temperatura (DINIZ; MARTIN, 1997). Dentre estas se destacam: a Alcalase (EC 3.4.21.62), uma subtilisina que pertence à subtilases, um grupo de proteases de serina, que inicia o ataque nucleofílico sobre a ligação peptídica (amida) por meio de um resíduo de serina no local ativo, seu resíduo característico do centro ativo é Asp-32, His-64, Ser-221 dispostos em uma tríade catalítica e possui uma ampla especificidade para um grande resíduo sem carga na posição P1; a Flavourzyme (EC 3.4.11.1) é uma exo e endopeptidase em que a principal clivagem é Leu-aminopeptidase; e a Protamex (E.C. 3.4.21.62 e E.C. 3.4.24.28) que como a Alcalase é uma subtilisina serina-endopeptidase e também uma bacillolisina metaloendopeptidase neutral em que sua principal clivagem são Leu, Phe, e outros (KUNST, 2003; NC-IUBMB, 1992).

A hidrólise enzimática das proteínas musculares é caracterizada por uma rápida fase inicial, durante a qual, várias ligações peptídicas são hidrolisadas. A seguir, esta taxa de hidrólise decresce e atinge uma fase estacionária, na qual nenhuma hidrólise aparente ocorre (KRISTINSSON; RASCO, 2000).

Os hidrolisados podem ser classificados conforme o GH e sua aplicação, agrupando-se em três blocos:

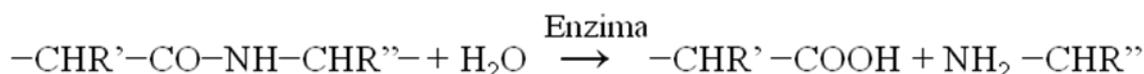
1. Hidrolisados com baixo GH, entre 1 e 10%, para a melhoria das propriedades funcionais;
2. Hidrolisados com GH variável, geralmente alto, para a utilização como aromatizantes;

3. Altamente hidrolisados, com GH superior a 10% para uso em alimentos para fins especiais (PEDROCHE et al., 2004).

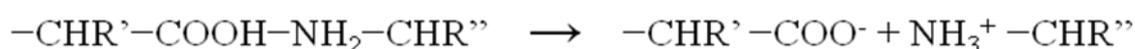
O GH pode ser medido através de diferentes métodos, como os que relacionam proteína solúvel e a proteína total descritos por Hoyle e Merrit (1994) e Liceaga-Gesualdo e Li-Chan (1999) e o do TNBS (ácido trinitrobenzenosulfônico) que determina a quantidade de grupos amino livre (ADLER-NISSEN, 1979). No entanto o primeiro apenas fornece um parâmetro e não uma medida de hidrólise e o segundo torna-se dificultoso para o acompanhamento cinético.

Dessa forma, o método estudado por Adler-Nissen (1986) em que foi baseado no seu trabalho anterior (ADLER-NISSEN, 1979), que utiliza o princípio do pHstat, que se dá pelo consumo de base padronizada (NaOH), durante a hidrólise a fim de manter o pH constante que é proporcional ao GH pode ser utilizado ao longo de uma hidrólise, fornecendo a cinética da reação. As proteinases atacam as ligações peptídicas nas proteínas como se segue:

1. Abertura da ligação peptídica:



2. Troca de próton:



3. Titulação dos grupos amino:



Sob condições alcalinas ou neutras de hidrólise, a dissociação dos grupos amino torna-se significativa e o consumo contínuo de base necessário para manter o pH constante durante a reação é, então, um meio conveniente de controlar o processo. Portanto, o GH é definido como a razão entre o número de ligações peptídicas clivadas (por unidade de peso) – h, para o número total de ligações peptídicas (por unidade de peso) – h_{total}.

O produto denominado pela sigla FPH (do inglês, Fish Protein Hydrolysate) ou HPP (Hidrolisado Proteico de Pescado), conforme designado pela FAO, pode atingir uma concentração de proteína de 90%, além de apresentar propriedades funcionais úteis para a

indústria alimentícia (OETTERER, 2001). Em geral, a hidrólise é um processo eficiente para a solubilização das proteínas do pescado. A produção de materiais solúveis que constituem o produto final da hidrólise depende de diversos fatores, tais como, reagentes químicos, tipo de enzima, substrato, pH, temperatura, tempo de incubação e concentração da enzima (MARTINS; COSTA; PRENTICE, 2009).

A hidrólise protéica de pescado com enzimas proteolíticas selecionadas fornece a possibilidade de controlar o grau de quebra da proteína no substrato, indicando como vantagens a utilização de proporções enzima/substrato e tempos de reação adequados, permitem a produção de hidrolisados com diferentes estruturas moleculares e funcionalidade, encontrando aplicações na indústria farmacêutica, de alimentos e cosméticos (KRISTINSSON; RASCO, 2000).

O estudo das condições de hidrólise proporciona obter um hidrolisado específico, que é importante para o preparo de produtos com propriedades funcionais únicas e características benéficas relacionadas à saúde sendo a ferramenta indispensável para identificar diferentes compostos bioativos. Após o processo de hidrólise por uma enzima específica, há necessidade da caracterização dos peptídeos obtidos. Vários métodos podem ser utilizados e incluem eletroforese em gel de poliacrilamida uni ou bidimensional, focalização isoeletrica, imunoeletroforese, cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR), eletroforese capilar e espectrometria de massa (PACHECO; AMAYA-FARFAN; SGARBIERI, 2002).

São necessárias pesquisas adicionais para a otimização dos processos enzimáticos (por exemplo, escolha de mais enzimas específicas, o desenvolvimento de modelos de previsão do grau de hidrólise e atividades biológicas), a fim de desenvolver hidrolisados ricos em peptídeos adequados para a elaboração de produtos específicos com compostos ativos (antioxidante, anti-hipertensivos, etc.). Além disso, os maiores esforços são necessários para recuperar os subprodutos de maior qualidade (por exemplo, baixa carga microbiana, com baixo teor em metais pesados e toxinas) e para a formação de pessoas que trabalham na recuperação de subprodutos de pescado (GUÉRARD et al., 2007).

Os peptídeos têm sido obtidos a partir de hidrolisados de diversas fontes alimentícias, principalmente leite (MEISEL, 2004; SAKANAKA et al., 2005), ovos (SAKANAKA et al., 2004), soja (CHEN; MURAMOTO; YAMAUCHI, 1995; GIBBS et al., 2004), pescado (GEIRSDÓTTIR, 2009; REN et al., 2008) e carne (LI et al., 2009; SAIGA, TANABE; NISHIMURA, 2003). Em especial, os resíduos da industrialização de alimentos, como de pescado (BOUGATEF et al., 2010; CUDENNEC et al., 2008), tem sido considerados um

material com grande potencial para ser utilizado na geração de peptídeos bioativos (BERNARDINI et al., 2011).

3.3 Alimentos funcionais e substâncias bioativas

O termo alimentos funcionais foi inicialmente introduzido pelo governo do Japão em meados de 1980, como o resultado de esforços para desenvolver alimentos que possibilitassem a redução dos gastos com saúde pública, considerando a elevada expectativa de vida no país (ARAI, 1996; HASLER, 1998; ARAYA; LUTZ, 2003).

Alegação de propriedade funcional é aquela relativa ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano. Enquanto, alegação de propriedade de saúde, é aquela que afirma, sugere ou implica a existência de relação entre o alimento ou ingrediente com doença ou condição relacionada à saúde (BRASIL, 1999).

De acordo com o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas, substância bioativa é aquela que, além dos nutrientes, os não nutrientes que possuem ação metabólica ou fisiológica específica, devem estar presentes em fontes alimentares e podem ser de origem natural ou sintética, desde que comprovada a segurança para o consumo humano (BRASIL, 2002).

Entretanto, não devem ser confundidos com “alimentos mágicos” ou com medicamentos tradicionais. Sendo uma área de estudo relativamente recente, um maior número de pesquisas sobre as substâncias biologicamente ativas contidas nesses alimentos é necessário para que se possam determinar seus efeitos benéficos com mais exatidão e quantificar as doses máximas e mínimas que podem ser ingeridas pela população, a fim de oferecer eficácia sem oferecer riscos de toxicidade e avaliar os efeitos colaterais através do uso prolongado (ANJO, 2004).

3.4 Antioxidantes

Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) são consideradas muito importantes na patogênese de várias doenças humanas, são gerados pelo nosso organismo por vários sistemas endógenos sob exposição à diferentes condições físico-químicas ou estados patológicos exógenos (BARRY, 1991; LOBO et al., 2010). Os radicais livres são as principais ERO, são muito instáveis e reagem rapidamente com grupos de outras substâncias químicas ou de

substâncias no organismo, levando a lesão celular ou tecidual resultando em danos à saúde (JE et al., 2009).

Um equilíbrio entre radicais livres e antioxidantes é necessário para a função fisiológica adequada. Se os radicais livres sobrecarregarem a capacidade do organismo para regulá-los, uma condição conhecida como estresse oxidativo se segue (LOBO et al., 2010). Enzimas celulares antioxidantes como a superóxido dismutase, a glutatona peroxidase e a catalase, e alguns antioxidantes derivados de alimentos protegem os tecidos de radicais livres mediados por lesões oxidativas (CHOW, 1988; MENDIS; RAJAPAKSE; KIM, 2005).

As reações de radicais livres, especialmente aqueles com a participação de elementos oxidantes, têm sido associados a muitos processos biológicos por danificar lipídeos, proteínas, membranas celulares e ácidos nucleicos, resultando em várias doenças humanas (LOBO et al., 2010; MADHAVI; DESHPANDE; SALUNKHE, 1996).

A ação dos antioxidantes ocorre através da inibição de ERO, que são gerados durante o processo oxidativo, assim, o seu uso está bem estabelecido como protetor dos componentes celulares contra o estresse oxidativo (EL-BAKY; EL-BAROTY, 2012; GAD et al., 2010) daí a aplicação de fontes externas de antioxidantes podem ajudar a combater este (LOBO et al., 2010). Antioxidantes são substâncias que retardam a velocidade da oxidação, através de um ou mais mecanismos, como inibição de radicais livres e complexação de metais. Eles podem ser sintéticos ou naturais e, para serem utilizados em alimentos, fármacos ou como suplementos nutricionais devem ser seguros para a saúde. Alguns dos antioxidantes sintéticos mais importantes são hidroxianisol de butila (BHA) e o hidroxitolueno de butila (BHT) e entre os naturais destacam-se o ácido ascórbico, α -tocoferol e β -caroteno (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006; JE et al., 2009).

Antioxidantes sintéticos têm sido relatados recentemente por serem potencialmente perigosos para a saúde humana. Assim, a busca de compostos naturais eficazes, não tóxicas com atividade antioxidante tem se intensificado nos últimos anos (LOBO et al., 2010). Bem como, algumas evidências têm sugerido que a ingestão de alguns componentes dos alimentos, como os antioxidantes, pode ter um efeito protetor no organismo atuando na prevenção ou redução da gravidade de doenças cardíacas, câncer e envelhecimento. (EL-BAKY; EL-BAROTY, 2012; GAD et al., 2010).

A peroxidação lipídica mediada por radicais livres, o estresse oxidativo e os antioxidantes continuam a ser amplamente discutidos. A formação de peróxidos lipídicos e compostos de baixa massa molar produzidos durante a fase tardia da reação de oxidação, ou seja, radicais livres como o ânion superóxido (O_2^-) e os radicais hidroxila ($\cdot OH$) é uma

consequência inevitável em organismos aeróbicos durante a respiração (JE et al., 2009). De forma descontrolada a peroxidação lipídica está envolvida na ocorrência de inúmeras doenças crônicas por causar danos à biomoléculas como aminoácidos, proteínas e DNA. Logo, a remoção de radicais livres, principalmente hidroxila, é provavelmente uma das mais eficazes alternativas na defesa de organismos vivos contra várias enfermidades (JE et al., 2009).

É reconhecido que a peroxidação lipídica em alimentos é de suma importância nas mudanças que afetam a qualidade, interferindo no sabor, textura e aparência dos alimentos (RAJAPAKSE et al., 2005). O desenvolvimento de sabores e odores desagradáveis, como o de ranço o tornam impróprios para consumo, além de também provocar outras alterações que irão afetar não só a qualidade nutricional, devido à degradação de vitaminas lipossolúveis e de ácidos graxos essenciais, mas também a integridade e segurança dos alimentos, através da formação de compostos poliméricos potencialmente tóxicos, o que leva à deterioração e encurta sua vida útil. Mesmo que o uso de alguns antioxidantes sintéticos para superar esses problemas na indústria de alimentos seja comum, ele está sob normas rígidas devido aos perigos potenciais à saúde (MENDIS; RAJAPAKSE; KIM, 2005; RAMALHO; JORGE, 2006).

A oxidação lipídica tem um papel importante também quanto à qualidade dos produtos farmacêuticos e cosméticos particularmente em relação às propriedades sensoriais (odor, cor, textura) que os tornam desejáveis (RAMALHO; JORGE, 2006).

Com a finalidade de inibir ou retardar a oxidação lipídica de óleos e gorduras são empregados compostos antioxidantes. Os lipídios são constituídos por uma mistura de tri, di e monoacilgliceróis, ácidos graxos livres, glicolipídios, fosfolipídios, esteróis e outras substâncias. A maior parte destes constituintes é oxidável em diferentes graus, sendo que os ácidos graxos insaturados são as estruturas mais susceptíveis ao processo oxidativo (RAMALHO; JORGE, 2006).

Deste modo, para evitar que os alimentos e cosméticos sofram deterioração além de fornecer proteção contra várias doenças, é importante inibir a peroxidação dos lipídios e formação de radicais livres que ocorrem no organismo e nos gêneros alimentícios (LI et al., 2008).

3.4.1 Mecanismo de ação e classificação

Os antioxidantes são comumente usados para inibir, prevenir ou retardar a deterioração pela oxidação, podendo atuar na redução dos radicais livres (antioxidante

primário) ou por um mecanismo que não envolve a redução direta dos radicais livres (antioxidante secundário). Os antioxidantes primários, como os compostos fenólicos, serão consumidos durante a fase de iniciação. Os antioxidantes secundários como o ácido ascórbico e o ácido cítrico, irão atuar por uma variedade de mecanismos incluindo a ligação com íons metálicos, a redução de oxigênio, a conversão de hidroperóxidos a espécies não-radicais, a absorção de radiação ultravioleta ou a desativação do $^1\text{O}_2$ – oxigênio singlete (MARIUTTI; BRAGAGNOLO, 2009).

O processo de peroxidação lipídica é iniciado pela reação de um radical livre com um ácido graxo insaturado e propagada por radicais peroxila. Resulta na formação de hidroperóxidos lipídicos e aldeídos, tais como o malonaldeído, 4-hidroxinonenal e isoprostanos, que podem ser detectados em amostras biológicas e utilizados para se avaliar o estresse oxidativo (LIMA; ABDALLA, 2001). Os lipídios podem ser oxidados por diferentes caminhos (RAMALHO; JORGE, 2006):

- Reações lipolíticas, que são catalisadas pelas enzimas lipase ou pela ação de calor e umidade, com formação de ácidos graxos livres;

- Oxidação enzimática, que ocorre pela ação das enzimas lipoxigenases que atuam sobre os ácidos graxos poli-insaturados, catalisando a adição de oxigênio à cadeia hidrocarbonada poli-insaturada. O resultado é a formação de peróxidos e hidroperóxidos com duplas ligações conjugadas que podem envolver-se em diferentes reações degradativas;

- Fotoxidação, cujo mecanismo acontece a partir de gorduras insaturadas e é promovida essencialmente pela radiação UV em presença de fotossensibilizadores (clorofila, mioglobina, riboflavina e outros) que absorvem a energia luminosa de comprimento de onda na faixa do visível e a transferem para o $^3\text{O}_2$ (oxigênio triplete), gerando o estado $^1\text{O}_2$ (oxigênio singlete);

- Por adição, formando hidroperóxidos diferentes dos que se observam na ausência de luz e de sensibilizadores, e que por degradação posterior originam aldeídos, alcoóis e hidrocarbonetos;

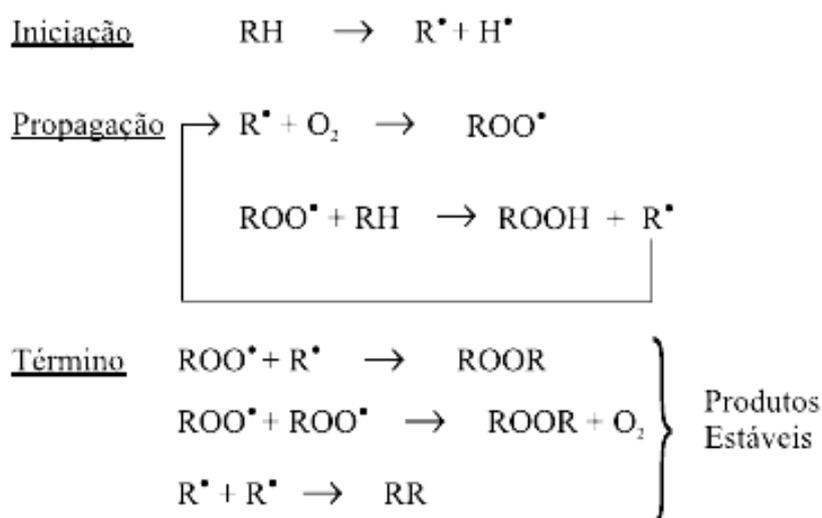
- Autoxidação, que é o principal mecanismo de oxidação dos óleos e gorduras e está associada à reação do oxigênio com três etapas ilustradas na Figura 2:

Iniciação – ocorre a formação dos radicais livres do ácido graxo devido à retirada de um hidrogênio do carbono alílico na molécula do ácido graxo, em condições favorecidas por luz e calor.

Propagação – os radicais livres que são prontamente susceptíveis ao ataque do oxigênio atmosférico, são convertidos em outros radicais, aparecendo os produtos primários de oxidação (peróxidos e hidroperóxidos) cuja estrutura depende da natureza dos ácidos graxos presentes. Os radicais livres formados atuam como propagadores da reação, resultando em um processo autocatalítico.

Término – dois radicais se combinam com a formação de produtos estáveis (produtos secundários de oxidação) obtidos por cisão e rearranjo dos peróxidos (epóxidos, compostos voláteis e não voláteis).

Figura 2 – Mecanismo de peroxidação lipídica – Esquema geral.



Onde: RH – Ácido graxo insaturado; R[•] – Radical; ROO[•] – Radical peróxido e ROOH – Hidroperóxido.

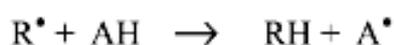
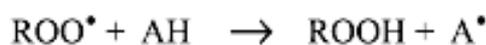
Para evitar a autoxidação de óleos e gorduras há a necessidade de diminuir a incidência de todos os fatores que a favorecem, mantendo ao mínimo os níveis de energia (temperatura e luz) que são responsáveis pelo desencadeamento do processo de formação de radicais livres, evitando a presença de traços de metais no óleo, evitando ao máximo o contato com oxigênio e bloqueando a formação de radicais livres por meio de antioxidantes, os quais, em pequenas quantidades, atuam interferindo nos processos de oxidação de lipídios (ARAÚJO, 1999; RAMALHO; JORGE, 2006).

Segundo Sánchez-Moreno (2002), os antioxidantes podem ser classificados em primários, sinergistas, removedores de oxigênio, biológicos, agentes quelantes/sequestrantes e antioxidantes mistos.

Os antioxidantes primários são compostos que promovem a remoção ou inativação dos radicais livres formados durante a iniciação ou propagação da reação, através da doação de

átomos de hidrogênio a estas moléculas, interrompendo a reação em cadeia representada pela Figura 3. Os sinergistas são substâncias com pouca ou nenhuma atividade antioxidante, que podem aumentar a atividade dos antioxidantes primários quando usados em combinação adequada. Os removedores de oxigênio são compostos que atuam capturando o oxigênio presente no meio, através de reações químicas estáveis tornando-os indisponíveis para atuarem como propagadores da autoxidação. Os antioxidantes biológicos incluem várias enzimas que podem remover oxigênio ou compostos altamente reativos de um sistema alimentício. Os agentes quelantes complexam íons metálicos, principalmente cobre e ferro, que catalisam a oxidação lipídica. E, por fim, os antioxidantes mistos incluem compostos de plantas e animais que têm sido amplamente estudados como antioxidantes em alimentos. Entre eles estão várias proteínas hidrolisadas, flavonóides e derivados de ácido cinâmico (ácido caféico) (RAMALHO; JORGE, 2006).

Figura 3 – Mecanismo de ação para os antioxidantes primários.



Onde: ROO[•] e R[•] – radicais livres; AH – antioxidante com um átomo de hidrogênio ativo e A[•] – radical inerte.

3.4.2 Peptídeos antioxidantes

Os peptídeos biologicamente ativos são derivados de alimentos que exercem, além da nutrição normal adequada, um efeito fisiológico semelhante aos hormônios em humanos, com funções de regulação. Muitos peptídeos de origem vegetal e animal com potencial bioativo relevante foram encontrados, no entanto os produtos a base de leite são, de longe, os mais estudados e isolados. Porém, ovos, carnes, pescado, vegetais, são bons candidatos por conter essas proteínas com atividades biológicas latentes (HARTMANN; MEISEL, 2007).

Os peptídeos bioativos estão inativos dentro da proteína intacta, mas podem ser liberados por hidrólise tanto durante a digestão gastrointestinal como no processamento do alimento, como em queijos ou leites fermentados. Normalmente contém de 2 a 20 resíduos de aminoácidos, mas em alguns casos podem conter mais de 20 aminoácidos. Após a digestão, os peptídeos bioativos podem ser absorvidos através do intestino, entrar na corrente sanguínea e exercer efeitos sistêmicos, ou ainda, produzir efeito local no trato gastrointestinal (ERDMANN; CHEUNG; SCHRÖDER, 2008).

Diferentes efeitos sobre a saúde têm sido atribuídos a alimentos derivados de peptídeos, que dependem da sequência de aminoácidos, incluindo propriedades antimicrobianas, anticarcinogênica, antiúlcera, ação anti-hipertensiva, hipocolesterolêmica, antitrombótica, antioxidante, inibição do apetite, aumento da absorção de minerais e/ou biodisponibilidade, efeitos imunomoduladores, atividades opióides, estímulo da síntese de proteínas para o controle da mobilidade intestinal e da secreção de enzimas digestivas (MEISEL, 2004).

Muitos dos peptídeos bioativos conhecidos são multifuncionais e podem exercer mais de um dos efeitos mencionados. Devido ao seu potencial reforço para saúde e perfil de segurança eles podem ser utilizados como componentes em alimentos funcionais ou nutracêuticos. Contudo, as proteínas do leite frequentemente são a principal fonte de vários peptídeos com funções bioativas que, devido ao consumo diário de lácteos comprova a sua importância em recém-nascidos e adultos (ERDMANN; CHEUNG; SCHRÖDER, 2008; KORHONEN; PIHLANTO, 2003; MEISEL, 2004; MEISEL; FITZGERALD, 2003).

Inúmeros produtos já estão no mercado ou em desenvolvimento por empresas de alimentos que exploram o potencial de alimentos derivados de peptídeos bioativos e que apresentam alegações de saúde cientificamente comprovadas com o consumo desses alimentos funcionais. Alguns desses produtos, entretanto, são alimentos tradicionais oferecidos agora com uma estratégia de marketing diferente (HARTMANN; MEISEL, 2007). Dessa forma, os HPP são significativamente interessantes para uma potencial aplicação por serem fonte de peptídeos biologicamente ativos (CUDENNEC et al., 2008). Isto levou a novas investigações utilizando diferentes fontes protéicas.

A atividade antioxidante foi identificada em diversos hidrolisados proteicos, como de soja (OLIVEIRA et al., 2014; PENA-RAMOS; XIONG, 2002), carnes (KIM et al., 2009; LI et al., 2007; SAIGA; TANABE; NISHIMURA, 2003), leite, caseinato e soro (CORRÊA et al., 2011; GAD et al., 2010; HERNÁNDEZ-LEDESMA et al., 2005; HIDALGO et al., 2012; SUETSUNA; UKEDA; OCHI, 2000), albumina da clara do ovo (TSUGE et al., 1991), elastina solúvel (HATTORI et al., 1998), algas (GAD et al., 2010), frango (CENTENARO; PIOTROWICZ; PRENTICE, 2008) e pescado (BOUGATEF et al., 2010; CENTENARO; PIOTROWICZ; PRENTICE, 2008; DONG et al., 2008; GUERARD et al., 2007; JE et al., 2009; YOU; REGENSTEIN; LIU, 2010; ZHUANG; LI; ZHAO, 2009). As propriedades antioxidantes destes hidrolisados têm sido atribuídas ao efeito cooperativo de um número de propriedades, incluindo a sua capacidade de sequestrar radicais livres, para atuar como quelante de íons metálicos, supressor de oxigênio ou doador de hidrogênio, e a possibilidade

de impedir a penetração de iniciadores da oxidação lipídica, formando uma membrana que envolve as gotículas de óleo (MOURE; DOMÍNGUEZ; PARAJÓ, 2006).

Os peptídeos que contêm aminoácidos hidrofóbicos, tais como fenilalanina e glicina, em sua sequência são relatados por contribuir para a inibição da peroxidação, aumentando a solubilidade do peptídeo em lipídios, facilitando assim uma melhor interação com radicais livres (RAJAPAKSE et al., 2005). Além disso, uma série de peptídeos antioxidantes, compostos geralmente de 3 a 16 resíduos de aminoácidos foram isolados a partir destes hidrolisados. Dentre esses peptídeos, alguns continham aminoácidos hidrofóbicos (valina ou leucina) na extremidade N-terminal, e prolina, histidina ou tirosina em sequência (CHEN; MURAMOTO; YAMAUCHI, 1995), e alguns resíduos contendo principalmente ácidos glutâmico e aspártico (SAIGA; TANABE; NISHIMURA, 2003).

Alguns peptídeos que contêm aminoácidos de cadeia ramificada (valina, leucina e isoleucina), mostraram significativa atividade antioxidante. Dipeptídeos contendo tirosina e triptofano no aminoácido N-terminal, e histidina e metionina no C-terminal, apresentaram maior atividade antioxidante que uma mistura de componente de aminoácido em sistemas aquosos (SUETSUNA; UKEDA; OCHI, 2000). O grupo sulfidrila (SH) da cisteína tem uma ação independentemente crucial devido a sua interação direta com radicais. Já tem sido relatado que grupos SH atuam como sequestradores de radicais livres em plantas e tecidos animais (PATTERSON; RHOADES, 1988), e grupos SH da cisteína promovem a atividade antioxidante da glutathione (SELVAM; DEVARAJ, 1996). Também atuam como sequestradores de radicais protegendo os tecidos contra o estresse oxidativo (SARMADI; ISMAIL, 2010).

Não somente o aminoácido terminal determina a atividade antioxidante de um peptídeo, mas também a sequência. Li et al. (2007) especularam as sequências Gln-Gly, Gly-Pro e Gly-Pro-Hyp que estavam presentes em diferentes peptídeos com propriedades antioxidantes, entretanto seu mecanismo de ação não foi elucidado.

Assim como o tamanho dos peptídeos também demonstra interferir na atividade antioxidante, sugerindo-se que quanto menor a massa molar maior a atividade antioxidante, encontrando-se na faixa entre 1000 e 3000 Da. Entretanto, alguns estudos apresentaram peptídeos com esta bioatividade com tamanho abaixo de 1000 Da (DONG et al., 2008; JE et al., 2009).

Jun et al. (2004) obtiveram um hidrolisado proteico de carcaça de atum amarelo em que se utilizou um método de hidrólise enzimática combinado, primeiramente se efetuou-a com pepsina dando sequência com extrato bruto intestinal de cavala para aumentar o GH, o

qual imputa como sendo um dos fatores ligados diretamente com a atividade antioxidante e confirmado experimentalmente no trabalho em questão. Frações peptídicas foram obtidas por ultrafiltração por membranas e a purificação da fração com maior potencial bioativo foi purificada cromatograficamente encontrando o peptídeo com 10 resíduos, Arg-Pro-Asp-Phe-Asp-Leu-Glu-Pro-Pro-Tyr, e 13 kDa. Foi atribuída ao aminoácido tirosina terminal a atividade antioxidante, devido a ser um potente doador de hidrogênio.

A atividade antioxidante de hidrolisado proteico de ossos de polaca do Alasca obtido através da ação de enzimas endógenas de cavala foi estudada por Je, Park e Kim (2005). Após, cinco frações peptídicas de diferentes massas molares foram obtidas através de UF por membranas. A fração peptídica com maior atividade antioxidante foi submetida à purificação e a sequência do peptídeo considerado responsável pela propriedade foi determinada como sendo Leu-Pro-His-Ser-Gly-Tyr com massa molar de 672 Da. De acordo com os autores, a tirosina terminal (por ser doadora de hidrogênio) e a histidina na sequência (pelo seu anel imidazol) na molécula, são os responsáveis pela atividade antioxidante no peptídeo obtido.

Ranathunga, Rajapakse e Kim (2006) testaram quatro enzimas diferentes (Alcalase, α -quimotripsina, tripsina e pepsina) para hidrolisar músculo de enguia congro. Os hidrolisados tiveram suas atividades antioxidantes comparadas ao do α -tocoferol e BHT, em que se destacou o hidrolisado de tripsina que foi fracionado por UF por membranas. A fração de menor massa molar (menor que 1 kDa) apresentou maior propriedade antioxidante sendo purificada usando consecutivas técnicas de cromatografia. A determinação das sequências revelou que continha nove aminoácidos em sua sequência (Leu-Gly-Leu-Asn-Gly-Asp-Asp-Val-Asn) e a massa molar identificada como 928 Da.

Diferentes hidrolisados de colágeno de pele suína foram obtidos a partir de distintas proteases, assim como a mistura das mesmas. Métodos cromatográficos consecutivos, incluindo cromatografia de filtração em gel, cromatografia de troca iônica e cromatografia líquida de alto desempenho foram utilizados para isolamento das frações peptídicas que mostraram elevada atividade. O peptídeo antioxidante purificado apresentou massa molar de 430 Da e Gln-Gly-Ala-Arg como sequência de aminoácidos (LI et al., 2007).

Bougatef et al. (2010) estudaram a hidrólise de subprodutos de sardinha com diversas enzimas. O hidrolisado gerado com extrato bruto de sardinha apresentou alta atividade antioxidante sendo fracionado por cromatografia de exclusão, onde a fração que forneceu maior atividade foi então fracionada por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. Sete peptídeos antioxidantes foram isolados e suas massas molares e sequências de aminoácidos determinados através de ESI-MS e ESI-MS/MS, respectivamente. Suas

estruturas foram identificadas como His-Leu-Tyr, Leu-Ala-Leu-Arg, Gly-Gly-Glu, Gly-Ala-His, Gly-Ala-Ala-Trp, Pro-His-Leu e Tyr-Gly-Ala -Leu-Ala-Ala-His, estando todos abaixo de 1 kDa.

Diversos pesquisadores têm sugerido o uso de peptídeos como ingredientes bioativos na preservação de alimentos, inibição de algumas doenças e envelhecimento, podendo ser adicionados em produtos alimentícios, fármacos, suplementos alimentares e cosméticos. Entretanto, pouco é conhecido sobre a estrutura de peptídeos antioxidantes em várias proteínas (LI et al., 2007), demonstrando a necessidade de estudos que esclareçam efetivamente quais as relações entre massa molar, sequência de aminoácidos, GH e atividade antioxidante dos peptídeos, assim como o seu mecanismo de atuação (BERNARDINI et al., 2011).

3.4.3 Métodos de determinação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante pode ser medida através de diferentes métodos dentro dos quais estão os *in vitro* por métodos químicos (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; Berset, 1995; CENTENARO; MELLADO; PRENTICE, 2011; DONG et al., 2008; DUARTE-ALMEIDA et al., 2006; GUERARD et al., 2007; GUO; KOUZUMA; YONEKURA, 2009; JE et al., 2009; JUN et al., 2004; MILARDOVIC; IVEKOVIC; GRABARIC, 2006; RE et al., 1999; SAKANAKA et al., 2004; WU; CHEN; SHIAU, 2003) ou *in vivo* por meio de células animais (HILGEMANN, 2010; SANDRINI et al., 2009), micro-organismos (MARTORELL et al., 2011; SOARES; ANDREAZZA; SALVADOR, 2004, 2005) ou em testes utilizando modelo animal (DIKALOVA; KADIISKA; MASON, 2001; GAD et al., 2010).

3.4.4 Métodos *in vitro*

Entre os métodos químicos se destaca o que utiliza como princípio a peroxidação lipídica utilizando o ácido linoleico (OSAWA; NAMIKI, 1985). Esta consiste na medição da inibição da oxidação de um lipídeo, de um sistema modelo, pelo antioxidante a ser testado (OLIVEIRA et al., 2009). Os hidroperóxidos gerados durante a oxidação do ácido linoleico reagem com o sulfato ferroso, originando o sulfato férrico e após, com adição do tiocianato férrico, ocorre a formação de um complexo de cor vermelho sangue, sendo analisado a 500 nm (NASCIMENTO; ARAÚJO; MELO, 2010). Após ser iniciado, o processo oxidativo torna-se autocatalítico e somente termina quando se esgotarem as reservas de ácidos graxos

insaturados e oxigênio (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). A redução da densidade ótica, pela ação do antioxidante, corresponde à interrupção da oxidação, pois o ácido linoleico não está disponível no meio e ocorre o surgimento de outros produtos secundários da degradação dos hidroperóxidos (CHEN et al., 1998).

O teste do poder redutor baseia-se na capacidade de alguns compostos reduzirem o íon ferricianeto ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$) a ferricianato ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$) e, na presença do íon férrico (proveniente do FeCl_3) na solução, formam o composto azul da Prússia (MELLO; PINHEIRO, 2012). É um método baseado na transferência de elétrons e mede a habilidade de um potencial antioxidante transferir um elétron a fim de reduzir radicais, metais ou carbonilas, o qual usa como indicativo a mudança de cor do oxidante (SUN; TANUMIHARDJO, 2007). Conforme aumenta a capacidade dos compostos em doar elétrons para que a reação de redução ocorra, a solução fica mais escura. Portanto o aumento da absorbância indica maior potencial redutor da amostra (YEN; CHEN, 1995).

O que determina as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) é um teste que avalia a formação de produtos finais da peroxidação lipídica, que podem ser potencialmente tóxicos para outras macromoléculas celulares (SANTOS et al., 2007). TBARS mede a concentração de malonaldeído (MDA), o produto mais abundante da oxidação de lipídeos, e outros produtos de oxidação secundários em uma amostra (ANTOLOVICH et al., 2002).

A lipoperoxidação caracteriza-se por aumento na produção de TBARS e MDA em consequência do ataque das ERO às membranas celulares, provocando perda de seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomos, e formação de produtos citotóxicos, culminando com a morte celular (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Como a membrana celular e a matriz intracelular são estruturas vitais para a célula, não é surpreendente verificar que a lesão induzida por ERO influencie na extensão dos processos das doenças (BULKLEY, 1983).

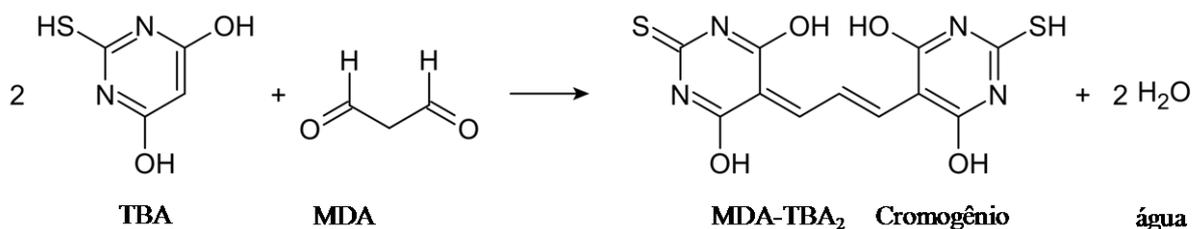
Apesar de suas limitações, o teste do TBA é o método mais usual na avaliação da oxidação de lipídios em carnes e produtos cárneos, devido à sua simplicidade e rapidez, porém não serve para produtos fritos e liofilizados (WILKINSON et al., 2001). Também é usado satisfatoriamente na avaliação dos estágios iniciais de rancidez de banhas, gorduras e óleos de soja, girassol e colza.

O teste de TBA quantifica o MDA, um dos principais produtos de decomposição dos hidroperóxidos de ácidos graxos poli-insaturados, formado durante o processo oxidativo – o MDA é um dialdeído de três carbonos, com grupos carbonilas nos carbonos C-1 e C-3. É um

teste altamente empírico e foi sugerido primeiramente por Patton, Keeney e Kurtz, em 1951, para leites e produtos lácteos (OSAWA; FELÍCIO; GONÇALVES, 2005).

A reação ocorre em meio ácido (pH 1-2) e alta temperatura (cerca de 100 °C) visando aumentar a velocidade e sensibilidade (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999) envolve o ácido 2-tiobarbitúrico com o MDA (Figura 4), produzindo um composto de cor vermelha, medido espectrofotometricamente a 532 nm de comprimento de onda (de acordo com a metodologia, esse comprimento de onda pode variar, situando-se ao redor de 500 a 550 nm). A formação do composto TBA-MDA, na proporção de 2:1, é possivelmente iniciada pelo ataque nucleofílico, envolvendo o carbono 5 do TBA e o carbono 1 do MDA, seguido de desidratação e reação similar subsequente do composto intermediário com uma segunda molécula de TBA, na proporção de 1:16. A quantificação de MDA é feita a partir de curvas de calibração construídas com concentrações conhecidas de MDA. Os padrões mais frequentemente utilizados são 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP) e 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) que, nas condições ácidas do teste, sofrem hidrólise, resultando na liberação do MDA (OSAWA; FELÍCIO; GONÇALVES, 2005).

Figura 4 – Reação do teste de TBA entre o ácido 2-tiobarbitúrico e o malonaldeído, formando o composto colorido, medido espectrofotometricamente a 532 nm.



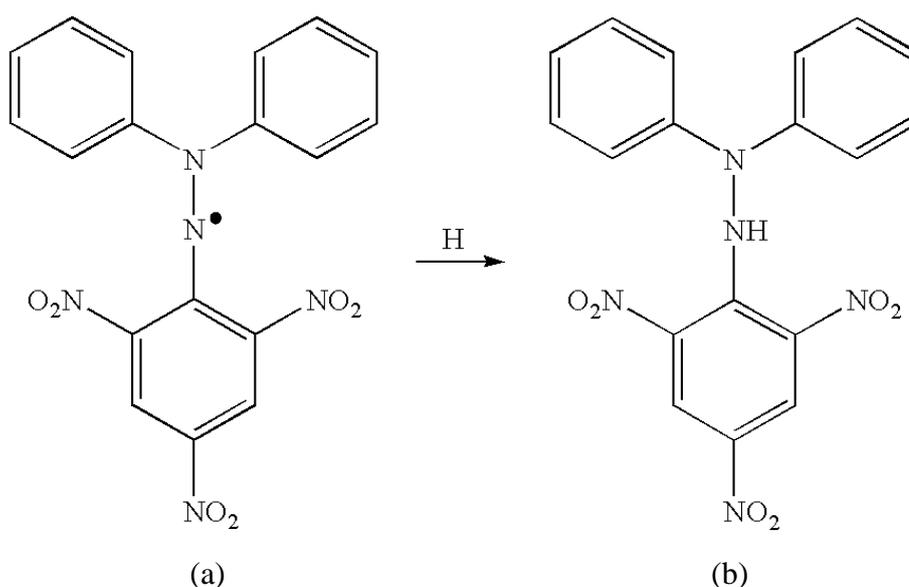
Fonte: Osawa, Felício e Gonçalves, 2005.

O teste do DPPH, inicialmente proposto por Blois (1958), é baseado na capacidade do radical livre estável, 1,1-difenil-2-picrilidrazil, reagir com compostos doadores de H^+ , o que pode interromper as reações oxidativas em cadeia. O DPPH pode reagir com compostos fenólicos, bem como com ácidos aromáticos contendo apenas um grupamento e tem sido amplamente utilizado para determinar a atividade antioxidante de alimentos (BOUGATEF et al., 2010; BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995; KULISIC et al., 2004; NGO et al., 2010; SANTOS et al., 2007).

A molécula de DPPH é caracterizada como um radical livre estável em virtude da deslocalização do elétron desemparelhado por toda a molécula. Esta deslocalização confere a

esta molécula uma coloração violeta, caracterizada por uma banda de absorção em etanol em cerca de 520 nm. Este ensaio se baseia na medida da capacidade antioxidante de uma determinada substância em sequestrar o radical DPPH (Figura 5), reduzindo-o a hidrazina. Quando uma determinada substância que age como doador de átomos de hidrogênio é adicionada a uma solução de DPPH, a hidrazina é obtida com mudança simultânea na coloração de violeta a amarelo pálido. Esta habilidade foi primeiramente avaliada espectroscopicamente por ressonância de elétron spin, uma vez que a intensidade do sinal do radical DPPH é inversamente relacionada com a concentração do antioxidante testado e o tempo de reação. Entretanto, o método de controle mais utilizado é o decaimento da absorbância no comprimento de onda observado entre 515 a 528 nm, produzido pela adição do antioxidante a uma solução alcoólica do radical DPPH (ALVES et al., 2010).

Figura 5 – Formas radicalar α,α -difenil- β -picrilidrazil (a) e não radicalar/reduzida α,α -difenil- β -picrilidrazina (b) do DPPH.



Fonte: Blois, 1958.

As substâncias analisadas podem interferir nos resultados caso seus espectros se sobreponham ao do DPPH ao redor de 515 nm como, por exemplo, os carotenóides. Sendo a acessibilidade estérica o fator determinante da reação, moléculas pequenas que têm melhor acesso ao sítio do radical podem apresentar uma maior atividade aparente quando comparada às moléculas maiores (ALVES et al., 2010).

3.4.5 Métodos *in vivo*

Embora existam ensaios químicos relativamente simples para avaliação da capacidade antioxidante, estes não são representativos das condições celulares do homem. Tendo em vista que antioxidantes assumem papel importante na medicina preventiva é necessário que as informações sejam obtidas a partir de sistemas biológicos. O estresse oxidativo acompanha numerosas patologias, e antioxidantes de baixa massa molar são compostos de grande interesse devido à sua capacidade de prevenir e aliviar os efeitos do estresse oxidativo. No entanto, apesar de muitos terem demonstrado ser eficazes como antioxidantes em sistemas *in vitro*, o seu efeito sobre as células e organismos pode ser complicado por problemas de permeabilidade e de efeitos secundários dos produtos das suas reações com oxidantes e do seu metabolismo. No entanto, a transição de um tubo de ensaio para os sistemas biológicos podem ser simples e não exigir a consideração de muitos fatores complicados (BEDNARSKA et al., 2008).

A avaliação da capacidade antioxidante empregando animais de laboratório é, em geral, de difícil execução e necessita de um número elevado de animais para assegurar resultados estatisticamente significativos. Diante das críticas que vem sofrendo, o meio científico por realizarem ensaios biológicos utilizando um modelo animal, juntamente com a conscientização da mesma, dos vetos dos Comitês de Ética e maior atuação dos órgãos de proteção dos direitos dos animais, tem demonstrado uma forte tendência em aplicar a política dos 3 Rs (em inglês, *replace, reduce, refine*) introduzida por Russel e Burch (1959), ou seja, substituição, redução, refinamento, não visando impedir a utilização dos modelos animais nos experimentos, mas a sua utilização de forma adequada e humanitária, sem comprometer a qualidade do trabalho científico que está sendo executado (MARONA; LUCCHESI, 2003; 2004).

É evidente que existe um crescente interesse por métodos alternativos dentro da própria comunidade científica na tentativa de reduzir o número de animais utilizados em experimentação e também o custo dos experimentos, pois animais utilizados em pesquisa necessitam ser acondicionados, alimentados e mantidos nas melhores condições de saúde e higiene possível, caso contrário não podem ser utilizados para propósitos científicos (OTA, 1986). A utilização de modelo animal em pesquisas científicas tem sido muito discutida por parte de ativistas que são simplesmente contra essa prática. Uma parte dos argumentos levantados por esse setor da sociedade é baseada no fato de que métodos alternativos são

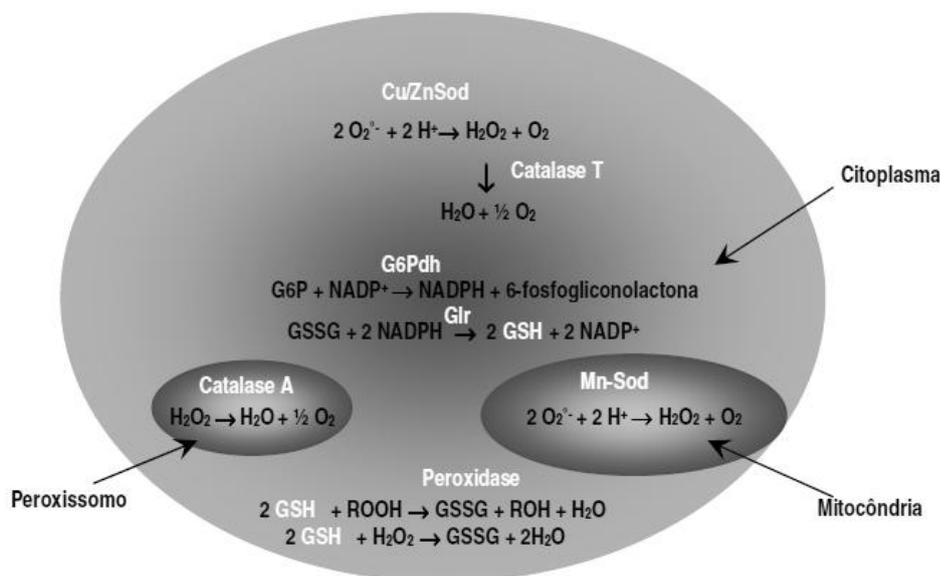
capazes de substituir a utilização dos animais em pesquisa, prática que se considera obsoleta (MORALES, 2008).

Portanto tem-se buscado investir em métodos alternativos *in vivo* que forneçam resultados coerentes, reprodutíveis e que elucidem diversos mecanismos que podem ser comparados ou correlacionados com o modelo humano. Deste modo, se apresentam os ensaios microbianos, utilizando-se principalmente células eucarióticas e os ensaios com células animais e humanas. A parede celular das células eucarióticas é permeável à muitas substâncias químicas com massa molar superior a 1 kDa (ZAHA; FERREIRA; PASSAGLIA, 2012). Os ensaios realizados com células têm se mostrado muito adequados na determinação da capacidade antioxidante, são fáceis, rápidos, econômicos, reprodutíveis e podem utilizar um grande número de células com as mesmas características genéticas (RABELLO-GAY; RODRIGUES; MONTELEONE NETO, 1991).

Os ensaios em células eucarióticas permitem a avaliação da atividade antioxidante de inúmeros compostos de forma rápida, econômica e reprodutível e os resultados obtidos podem ser mais facilmente extrapolados para o homem, do que os obtidos em ensaios químicos (HENRIQUES et al., 2001; SOARES; ANDREAZZA; SALVADOR, 2003). A avaliação da capacidade antioxidante pode ser feita pela medida da sobrevivência de células tratadas com os antioxidantes em presença e ausência de agentes estressores (BEDNARSKA et al., 2008; CIPAK et al., 2008; DANI et al., 2008; GUARIENTI; BERTOLIN; COSTA, 2010; SOARES; ANDREAZZA; SALVADOR, 2003, 2004, 2005).

Especificamente em estudos relacionados ao estresse oxidativo as células são capazes de detectar o aumento de oxidação, causado pelas ERO, e desencadear uma elaborada resposta de adaptação que ativa os dois sistemas de defesa antioxidante: enzimático e não-enzimático (COSTA; MORADAS-FERREIRA, 2001). Muitas células possuem o sistema de defesa celular contra as ERO similar ao apresentado em células humanas (Figura 6) (MAGER; WINDERICX, 2005).

Figura 6 – Algumas reações do sistema de defesa antioxidante em uma célula.



Fonte: Mariani, 2008.

Células animais têm sido muito utilizadas em diferentes tipos de ensaios, entre elas a citotoxicidade e a atividade antioxidante através da capacidade de inibir as ERO. Um dos tipos de células utilizados são os hepatócitos de *zebrafish* (*Danio rerio*) peixe-zebra, usado como modelo em vários estudos, principalmente toxicológicos (AMANUMA et al, 2000; CRAIG; WOOD; MCCLELLAND, 2007; POMATI et al, 2007; SEOK et al, 2006). Estes estudos demonstraram que muitos mecanismos fisiológicos entre *zebrafish* e mamíferos são semelhantes. Nestes, as células são expostas a diferentes concentrações do composto a ser estudado e são analisados o número de células viáveis e a produção de ERO (RIBAS-FERREIRA et al., 2014).

Estes ensaios podem ser um pré-determinante de oxidação, sendo um ensaio prévio para permitir/facilitar o seguimento dos estudos e também verificar a possível toxicidade antes que os compostos sejam adicionados em alimentos, nutracêuticos ou cosméticos.

Células humanas também são uma alternativa para determinar diversas bioatividades, em que a antioxidante se destaca, visto que a oxidação pode ser precursora de outras doenças como arteriosclerose, inflamações e câncer (FRLICH; RIEDERER, 1995). Células de hepatoma humano foram tratadas com sequência peptídica purificada de hidrolisado de gelatina de corvina e foi verificado que os níveis das enzimas antioxidativas, dismutase superóxido, catalase e glutathione peroxidase foram aumentados significativamente com relação ao controle demonstrando que peptídeos podem controlar o potencial redox no interior da célula (MENDIS; RAJAPAKSE; KIM, 2005).

O DNA é outro biomarcador sensível ao dano oxidativo mediado por ROS, estes danos gerados ao DNA pelos ROS podem iniciar carcinogénese ou propiciar doenças neurodegenerativas tais como a doença de Parkinson e doença de Alzheimer; entre ROS, o radical hidroxila é reconhecido como um agente danificador de DNA (YOU et al., 2002). Kim, Je e Kim (2007) investigaram o efeito protetor de peptídeo oriundo de hidrolisado proteico de carcaça de corvina sobre os danos induzidos pelo radical hidroxila no DNA demonstrando eficientemente que este radical foi reduzido pelo peptídeo antioxidante.

Portanto, a utilização de células como um modelo vivo é um meio confiável para determinar especificamente a capacidade de inibir a oxidação, pois é possível utilizar e avaliar o mecanismo que se deseja no tipo celular que se pretende.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Matéria prima e reagentes

A matéria prima utilizada neste trabalho foi oriunda do bijupirá (*Rachycentron canadum*). Os espécimes foram obtidos por despesca em tanques de cultivo *offshore* da companhia Aqualíder Maricultura Ltda localizada a 10 km mar adentro de Recife-PE, e em tanques de cultivo *nearshore* da Fazenda Aquicultura Pousada do sol, localizada a 100 m de Angra dos Reis-RJ. O material foi transportado em recipientes térmicos com gelo na proporção 1:1 até o Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), onde foi realizado o processamento. O pescado foi imediatamente, lavado com água clorada 5 ppm, descabeçado e eviscerado. O pescado limpo foi triturado em separador mecânico de carnes (HIGH TECH HT/2500 – Brasil) para separação da carne dos ossos e pele para então ser obtida a matéria prima denominada músculo, assim como a cabeça e vísceras que foram trituradas no mesmo equipamento a fim de separar os ossos e a pele para obtenção da matéria prima denominada resíduo, ambos foram acondicionados separadamente (músculo e resíduo) em embalagens plásticas de polietileno e armazenados sob congelamento a -18 ± 2 °C (CONSUL CHB/53) até a utilização.

Antes do uso, as matérias primas foram descongeladas *overnight* sob temperatura de refrigeração (6 ± 1 °C). O resíduo foi centrifugado a $8667 \times g$ por 30 min à temperatura ambiente em centrífuga de copos para reduzir o conteúdo de lipídeos (sobrenadante).

As enzimas utilizadas neste trabalho foram: Alcalase (endopeptidase de *Bacillus licheniformis*), Flavourzyme (mistura de endoprotease e exopeptidase de *Aspergillus oryzae*), doadas pela Novozymes Latin America, representante Tovani Benzaquem Rep. Ltda (Araucária, Brasil). A enzima Protamex (mistura de endo e exopeptidase, de *Bacillus* sp.), obtida do pâncreas bovino, foi adquirida da Sigma-Aldrich Co (St. Louis, MO, EUA). Os demais reagentes foram de grau analítico (P.A.).

4.1.2 Infraestrutura

O trabalho foi desenvolvido no LTA e na Unidade de Processamento de Pescado-UPP, ambos localizados atualmente no Campus Carreiros da Universidade Federal do Rio Grande

(FURG). Também foram utilizados outros laboratórios do Núcleo de Engenharia de Alimentos da FURG, os quais disponibilizaram a infra-estrutura necessária para apoio.

Para o ensaio com células animais foi utilizado o Laboratório de Cultura Celular do Instituto de Ciências Biológicas da FURG. E as análises de microscopia foram realizadas no CEME-SUL (Centro de Microscopia Eletrônica da Zona Sul) na FURG.

4.2 Métodos

4.2.1 Caracterização da matéria prima

A composição proximal das matérias primas (músculo e resíduo) foi realizada conforme as metodologias recomendadas pela AOAC (2000). As análises realizadas foram de umidade (gravimetria), proteínas (micro-Kjeldahl, fator 6,25), lipídeos (Soxhlet) e cinzas (gravimetria), identificadas com os protocolos de nº 960,39; 992,15; 925,30 e 923,03, respectivamente.

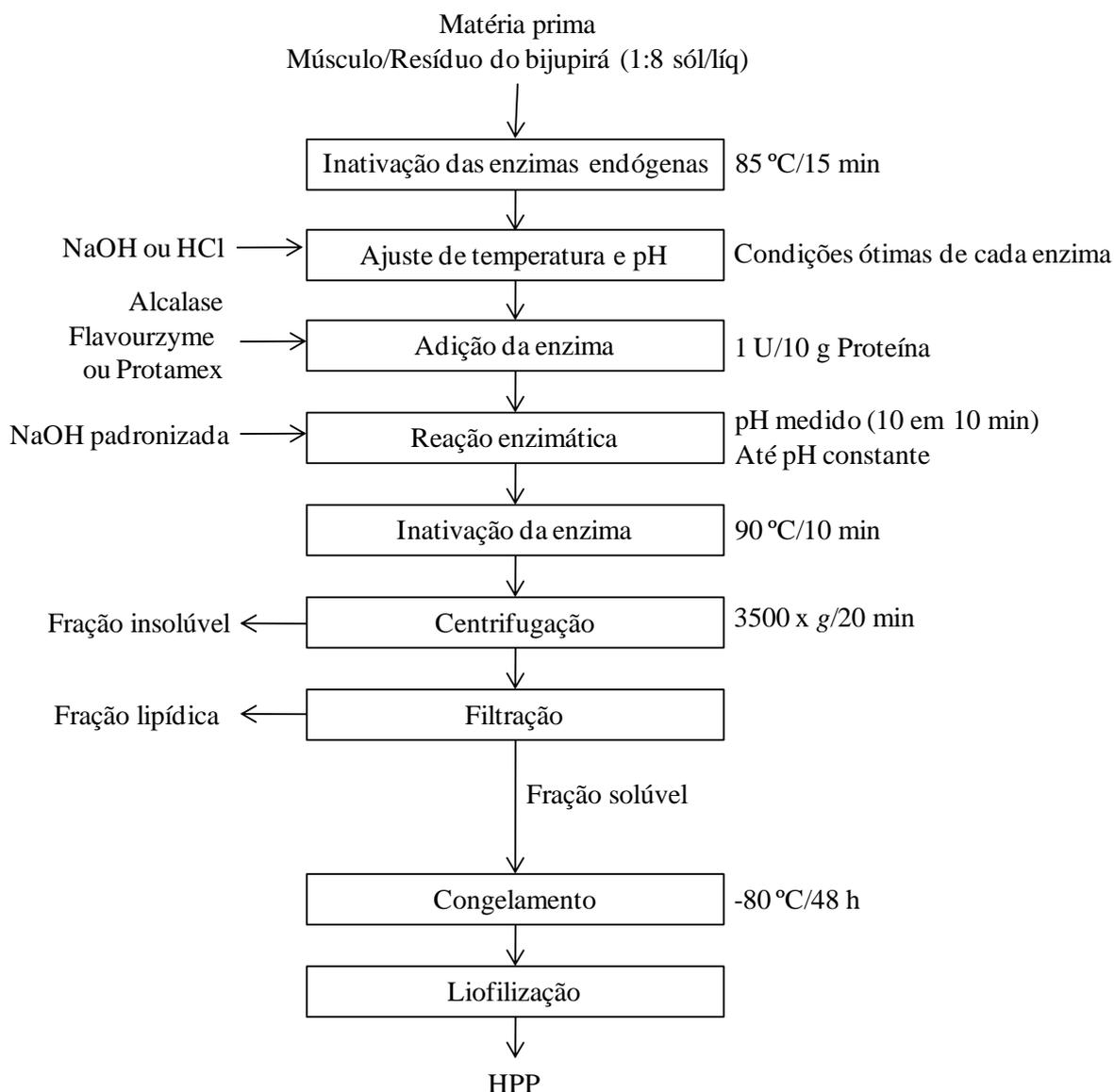
Para a realização da eletroforese, as amostras foram diluídas a 0,2% (m/v) de proteína, adicionadas de tampão Tris 0,5 M pH 6,8, contendo β -mercaptoetanol, desnaturadas por aquecimento a 90 °C por 5 min e analisadas em gel de poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) utilizando um gel de concentração de 4% (m/v) e de separação de 12% (m/v) (Sistema de Electroforese vertical 10x10 cm) com base no método descrito por Laemmli (1970). O gel foi corado com 0,1% de Azul Brilhante de Coomassie (m/v) e descorado com 10% de ácido acético (v/v) e metanol 25% (v/v). A análise qualitativa de identificação das bandas foi através de imagens dos géis revelados utilizando o *software* Gelanalyzer (GelAnalyzer, 2010).

A atividade proteolítica medida em U, o qual uma unidade corresponde a μ mol de tirosina livre/min, das enzimas Alcalase, Flavourzyme e Protamex foi determinada segundo método padrão da Sigma (1999), exposto no Anexo 1, que relaciona a capacidade de hidrolisar a caseína em um tempo de 10 min sendo após realizada uma reação baseada no princípio de Folin & Ciocalteu em meio alcalino utilizando uma curva padrão do aminoácido tirosina (Apêndice 2). Para obtenção da atividade específica (μ mol/min/g) (Apêndice 1) foi realizada a determinação do teor proteico da enzima através do método de Lowry et al. (1951) que quantifica proteínas solúveis, com uma curva padrão de albumina (Apêndice 3).

4.2.2 Obtenção dos hidrolisados proteicos de bijupirá

Os hidrolisados enzimáticos foram obtidos a partir de duas frações de pescado (músculo e do resíduo) em separado, baseados em processo sugerido por Kristinsson e Rasco (2000). Primeiramente, as matérias primas foram homogeneizadas em água destilada na proporção 1:8 (sólido/líquido) utilizando as condições de concentração de enzima e substrato proteico 1U:10g que correspondeu em massa/massa à 0,10; 4,33 e 1,19%, para as respectivas enzimas Alcalase, Flavourzyme e Protamex, de acordo com a atividade específica.

Acompanhando a Figura 7, para a obtenção dos hidrolisados foram utilizadas três enzimas separadamente de acordo com suas condições ótimas, Alcalase (pH 8,0 e 50 °C), Flavourzyme (pH 7,0 e 50 °C) e Protamex (pH 7,0 e 40 °C) (JUNG et al, 2006). A reação ocorreu em um reator de vidro, de parede dupla, conectado a um banho termostatizado (BROOKFIELD TC/102 – EUA) com agitação mecânica de 600 rpm, e um eletrodo de medição de pH introduzido. Antes do início das hidrólises, as enzimas endógenas presentes nas matérias primas foram inativadas a 85 °C por 15 min, este propicia ainda abertura de algumas cadeias da proteína facilitando a atuação das enzimas. Foram ajustados os parâmetros de pH (com adição de hidróxido de sódio 1 M ou ácido clorídrico 1 M) e temperatura de acordo com cada enzima. As hidrólises foram interrompidas quando o grau de hidrólise (GH) se tornou constante, portanto, em tempo variável (300 a 730 min). Este tempo de cessamento da reação foi estipulado como a não adição de hidróxido de sódio padronizado para ajuste do pH por 60 min. O GH foi determinado de acordo com o item 4.2.3. Após, foi realizada a inativação da enzima (90 °C/10 min) em banho termostatizado (QUIMIS, modelo 218.2 – Brasil). Os hidrolisados foram arrefecidos, centrifugados (3500 x g por 20 min) (BIOSYSTEMS MPW-350/350-R – Brasil) para separação da fração insolúvel, os sobrenadantes filtrados para a retirada da fração lipídica e as frações solúveis congeladas à -80 °C por 48 h, liofilizados (LIOBRAS, modelo L108) e armazenados a -18 ± 2 °C para posteriores análises de atividade antioxidante (item 4.2.7).

Figura 7 – Fluxograma do processo de obtenção dos hidrolisados proteicos.

4.2.3 Determinação do grau de hidrólise (GH)

O GH foi determinado pelo método do pH-*stat*, segundo Adler-Nissen (1986), com modificações, sendo utilizada uma solução alcalina padronizada de NaOH 0,2 M para ajuste do pH constantemente. A cada 10 min foram medidos os volumes gastos de NaOH para realizar o acompanhamento cinético. O GH foi calculado segundo Equação 1.

$$GH(\%) = \frac{BN_B}{\alpha h_{tot} \times mP} \times 100 \quad (1)$$

Onde: h_{tot} é o número de ligações peptídicas (moles equiv/kg) que para pescado o valor é 8,6 moles equiv/kg (ADLER-NISSEN, 1986); B é o volume da base consumida durante a hidrólise para manter o pH constante (mL); N_B é a normalidade da base; mP é a massa de proteína (g, determinado em $N \times$ fator de Kjeldahl – 6,25); e α é o grau de dissociação.

O grau de dissociação α é calculado segundo a Equação 2.

$$\alpha = \frac{10^{pH-pK}}{1 + 10^{pH-pK}} \quad (2)$$

Onde: pH é o pH durante a hidrólise e pK é a constante de dissociação.

Os valores de pK a diferentes temperaturas, pode ser calculado segundo a Equação 3.

$$pK = 7,8 + \frac{298 - T}{298T} \times 2400 \quad (3)$$

Onde: T é a temperatura absoluta durante a hidrólise (em Kelvin).

4.2.4 Determinação de proteínas solúveis expressas em tirosina

Foi determinado o teor de proteínas solúveis, quantificando o aminoácido tirosina conforme Sigma (1999) (Anexo 1) na suspensão antes da hidrólise e após a inativação térmica da enzima utilizada na reação (no término da hidrólise). Foi considerada a diferença antes e após o processo e quantificado através da curva padrão de tirosina (Apêndice 2). Este também é uma forma indireta de verificar se houve hidrólise.

4.2.5 Fracionamento dos hidrolisados proteicos utilizando ultrafiltração (UF)

Os hidrolisados foram fracionados utilizando uma célula de UF (300 mL, Advantec MFS Inc., Japão Mod. UHP-76) com agitação magnética (agitador Fisatom Mod 751). As membranas de UF (Millipore Corporation, Billerica, U.S.A., de celulose regenerada, 76 mm de diâmetro) apresentam massa molar de corte (*cut-off*) de 3 kDa. Antes de cada filtração as membranas foram lavadas com água ultrapura, conforme determinação do fabricante das

membranas e após foi utilizada uma pressão transmembrana de 55 psi por 5 min para retirada da água. Durante cada processo de filtração aplicou-se pressão com gás nitrogênio de 60 psi (4,14 bar), agitação de 400 rpm e temperatura de 21 ± 1 °C. As amostras foram passadas através das membranas em uma concentração de 7,5 mg/mL (CARREIRA et al. 2003) onde foram coletadas 2 frações: retentado (fração maior que 3 kDa) e permeado (fração menor que 3 kDa). O fluxo foi acompanhado em mililitros a cada 5 min. Em seguida as amostras foram congeladas à -80 °C por 48 h e liofilizadas e logo, analisada a atividade antioxidante de cada fração, conforme item 4.2.7 (CENTENARO et al, 2014). Após uso, as membranas foram tratadas conforme instruções do fabricante para sua posterior reutilização.

A fim de se verificar a capacidade de reutilização e regeneração das membranas utilizadas (sem uso, primeiro e segundo usos), as mesmas foram submetidas à secagem à vácuo em estufa (Quimis – Q819V2) à 100 mmHg, 35 °C durante 20 min. Suas microestruturas foram avaliadas no CEME-SUL-FURG, através da microscopia eletrônica de varredura (MEV), utilizando um microscópio eletrônico de varredura (JEOL, JSM-6010LV, Japão) operado a 15 kV. As amostras das membranas foram colocadas em suporte de alumínio (*stubs*) e recobertas com carbono (*Sputter Coater DESK V*) para melhorar a condutibilidade. As micrografias foram analisadas com 3000x e 6000x de ampliação.

4.2.6 Determinação dos grupos sulfidrilos dos hidrolisados e das frações peptídicas

O teor total dos grupos sulfidrilos (SH) foi determinado utilizando o reagente de Ellman (5,5 ditiobis-ácido 2-nitrobenzóico, 10 mM/L) de acordo com o procedimento descrito por Shimada e Cheftel (1988) com algumas modificações. Amostras (100 mg) de hidrolisado liofilizado foram homogeneizadas durante 3 min com 50 mL de tampão fosfato 0,1 M/L, pH 8,0, contendo ácido etilenodiamino tetra-acético 1 mM/L, 6 M/L uréia e 0,5 % dodecil sulfato de sódio. Em seguida, a mistura foi centrifugada a $8667 \times g$ (Biosystems, modelo MPW-350/350R – Brasil) durante 20 min. Em 3 mL do sobrenadante foram adicionados 30 µL do reagente de Ellman e a mistura foi incubada 15 min à temperatura ambiente (25 ± 1 °C). Após a reação, a absorbância da mistura foi medida a 412 nm em espectrofotômetro (Biospectro UV, modelo SP-22, Brasil) e os grupos R-SH determinados utilizando um coeficiente de extinção molar de 13600/M cm (BEVERIDGE; JONES; TUNG, 1986).

4.2.7 Medida da atividade antioxidante dos hidrolisados e frações peptídicas

4.2.7.1 Sequestro do radical DPPH•

A medida de atividade antioxidante foi realizada segundo Shimada et al. (1992) baseada no efeito sequestrante do radical livre 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH) pelos hidrolisados, sendo expresso em porcentagem, conforme a Equação 4. Foram utilizadas duas concentrações diferentes de cada hidrolisado (2,5 e 5,0 mg/mL). Um volume de 1 mL de amostra foi misturado com 1 mL de solução de DPPH 0,1 mM em etanol 95%. Após 30 min de repouso as amostras foram lidas em espectrofotômetro (BIOSPECTRO SP/22) a 517 nm. Quanto menor absorvância maior efeito sequestrante do radical DPPH. Foi utilizado como controle o antioxidante comercial BHT na mesma concentração. As análises dos integrais e das frações peptídicas foram realizadas em momentos distintos.

$$\% ES = \left(\frac{ABS_{branco} - ABS_{amostra}}{ABS_{branco}} \right) \times 100 \quad (4)$$

Onde: %ES é a porcentagem de efeito sequestrante; ABS_{branco} a absorvância do branco e $ABS_{amostra}$ é a absorvância da amostra.

4.2.7.2 Poder redutor

O poder redutor foi medido segundo o método realizado por Oyaizu (1986). Para esta determinação uma amostra de 2 mL de solução de hidrolisado 5,0 mg/mL foi misturada com 2 mL de tampão fosfato de sódio 0,2 M (pH 6,6) e 2 mL ferrocianeto de potássio 1,0%. Essa mistura foi incubada em banho a 50 °C (QUIMIS Q-215-1/2 – Brasil) por 20 min. Em seguida foi adicionado 2 mL de TCA 10%. Alíquotas de 2 mL das amostras incubadas foram misturadas com 2 mL de água destilada e 0,4 mL de cloreto férrico 0,1%. Após 10 min a absorvância da solução resultante foi lida a 700 nm em espectrofotômetro (BIOSPECTRO SP/22). O aumento da absorvância da mistura da reação indica um aumento do poder redutor. As análises dos integrais e das frações peptídicas foram realizadas em momentos distintos.

4.2.7.3 Sistema modelo do ácido linoleico

A atividade antioxidante foi medida segundo Osawa e Namiki (1985) empregando um sistema modelo contendo ácido linoleico. Foram dissolvidos 5 mg de hidrolisado em 10 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 7,0). Adicionou-se 0,13 mL de ácido linoleico e 10 mL de etanol 99,5%. A suspensão foi homogeneizada em agitador de soluções tipo vórtex (PHOENIX AP56 – São Paulo) e seu volume elevado até 25 mL com água destilada. O conjunto foi incubado em estufa BIOPAR 5150/BA, no escuro, a 40 °C, sendo então analisado a cada 24 h durante 6 dias. A análise diária consistiu em medir a oxidação do ácido linoleico. Assim, 100 µL de amostra incubada foram misturadas com 4,7 mL de etanol 75%, 100 µL de tiocianato de amônio 30% e 100 µL de cloreto ferroso 0,02 M em HCl 3,5% em frascos âmbar. Esta mistura foi deixada em repouso durante 3 min e lida em espectrofotômetro (BIOSPECTRO SP/22) a 500 nm. Foram utilizados como padrão o antioxidante comercial α -tocoferol e o ácido ascórbico diluídos em etanol 99,5%, na mesma concentração. As análises dos integrais e das frações peptídicas foram realizadas em momentos distintos.

4.2.7.4 Técnica *in vivo* em células animais

A linhagem celular utilizada foram os hepatócitos de *ZFL-zebrafish* (*Danio rerio*) mantida com meio de cultura RPMI 1640, suplementado com bicarbonato de sódio (0,2 g/L), L-glutamina (0,3 g/L) e tampão Hepes (3 g/L), com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico e antimicótico, em garrafas de cultura a 28 °C. As células de *zebrafish* (3×10^5 células/mL) foram incubadas por 48 h para aderência em placas de cultura de 96 poços a 28 °C. As células foram tratadas em meio contendo diferentes concentrações (0,1; 1,0; 10 e 100 µg/mL) de peptídeos por um período de 0, 24, 48 e 72 h e as células controle receberam o mesmo volume do veículo utilizado para solubilizar os compostos (água destilada estéril). Após tratadas, as células foram incubadas a 28 °C.

A viabilidade celular foi avaliada pelo método do brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) imediatamente, 24, 48 e 72 h, após a exposição às diferentes concentrações de peptídeos, de acordo com Trindade et al. (1999). Resumidamente, as células após a incubação, foram lavadas com PBS (solução tampão de fosfato padrão) e adicionados de 200 µL de meio de cultura e 20 µL de solução de MTT (5 mg/mL) em cada poço. As placas foram incubadas por 3 h a 28 °C. O meio contendo MTT foi removido e os cristais de

formazan dissolvidos em 200 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma). Os valores de absorvância a 490 nm foram determinados na leitora de placas ELISA (ELX 800 Universal Leitora, Bio-TEK).

Para a formação de ERO as células expostas aos peptídeos (1,0 e 10 μ g/mL) foram incubadas a 28 °C por 30 min em PBS com diacetato de 2',7'diclorofluoresceína (H2DCF-DA) na concentração final de 40 μ M, de acordo com Myhre e Fonnum (2001). O composto H2DCF-DA é clivado por esterases intracelulares presentes na amostra gerando o composto fluorescente dicloro-fluoresceína. Após incubação com H2DCF-DA, as células foram lavadas com PBS 2 vezes e ressuspensas neste. Alíquotas de 160 μ L de cada amostra foram colocadas em uma placa de leitura e a intensidade da fluorescência determinada durante 30 min a 28 °C com fluorímetro Victor 2 (Perkin Elmer) com comprimentos de onda de excitação de 485 nm e emissão em 520 nm. O cálculo da fluorescência total produzida é feito através da integração da função polinomial de segunda ordem relacionando as unidades de fluorescência em função do tempo.

4.2.8 Aplicação dos hidrolisados e frações peptídicas em alimentos

A atividade antioxidante foi determinada em dois tipos de alimentos cárneos, conforme descrito por Sakanaka et al. (2005). Cinco gramas de amostra (toucinho triturado e carne bovina moída) foram homogeneizadas em 25 mL de tampão HEPES 50 mM/L (pH 7,0). A mistura contendo 0,8 mL de suspensão cárnea foi adicionada de: 0,2 mL de tampão HEPES (branco), BHT ou α -tocoferol na concentração final de 10 mg/mL (controles), uma amostra de uma solução de hidrolisado (hidrolisado em tampão HEPES) na concentração final de 10 mg/mL foram incubadas a 37 °C por 60 min. Após a incubação, a mistura foi avaliada pela formação de TBARS. Uma solução de TCA/TBA consistindo de TCA 0,9 M/L e TBA 0,03 M/L em HCl 0,25 M/L foi preparada no dia do uso e submetida a leve aquecimento e agitação para dissolver os componentes, 3 mL de BHT 20 g/L em etanol absoluto foram adicionados para 100 mL de solução de TCA/TBA. Em 1,0 mL da mistura foram adicionadas de 2 mL de solução TCA/TBA/BHT e imediatamente misturadas em vórtex (Phoenix, AP-56, Brasil). As amostras foram então aquecidas até ebulição por 10 min em banho-maria, resfriadas à temperatura ambiente em banho de água corrente e centrifugadas a 1710 x g (Biosystems, modelo MPW-350/350R) por 10 min. A absorvância do sobrenadante foi medida a 532 nm. TBARS foram calculadas a partir da construção de uma curva padrão de malonaldeído utilizando tetraetoxipropano (Apêndice 4).

4.2.9 Análise estatística

Os ensaios foram realizados no mínimo em triplicata e os resultados avaliados estatisticamente mediante a Análise de Variância (ANOVA) e as médias comparadas entre si através do teste de Tukey ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização da matéria prima

Na literatura podem-se encontrar diversas pesquisas a respeito do bijupirá, porém muito sobre seu cultivo em aquicultura (CHOU; SU; CHEN, 2001; LIU et al, 2009; NGUYEN et al., 2014; ZHOU et al., 2005). Tais trabalhos fornecem uma grande variação com relação à composição deste pescado, como os encontrados por Chuang, Lin e Shiau (2007) que avaliaram o dorso e o ventre do bijupirá em diferentes tempos de cultivo em tanques *offshore* e obtiveram valores em base úmida entre 57,58 e 80,32% para umidade, 16,88 e 22,25% para proteína, 0,47 e 22,07% para lipídios e 0,98 e 1,90% para cinzas. Os mesmos autores, em 2010, avaliaram o dorso e o ventre do bijupirá capturado e por despesca de dois distintos tanques de cultivo e encontraram valores que variam de 65,03 a 77,14%; 17,82 a 20,25%; 2,64 a 16,65% e 1,23 a 1,46% respectivamente para umidade, proteínas, lipídeos e cinzas.

Portanto, convenientemente o mesmo também pode ser comparado, em parte, ao salmão devido a algumas características semelhantes, como a sua taxa de crescimento. Pesquisadores como Salan, Galvão e Oetterer (2006) avaliaram o filé de salmão encontrando 58,29; 35,26 e 2,87% e Tonial et al (2010) com 60,46; 34,80 e 4,17% para proteínas, lipídeos e cinzas, respectivamente, em base seca. Segundo a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO, 2011) não há dados sobre o bijupirá, porém para o salmão sem pele, fresco e cru apresenta valores de 62,26% de proteína, de 31,29% de lipídios e de 3,87% de cinzas. Comparando estes valores com os dispostos na Tabela 1 pode-se observar que os valores da composição do músculo do bijupirá concordaram com a literatura.

Tabela 1 – Composição proximal do músculo e resíduo de bijupirá utilizado para hidrólise.

Amostra	Umidade (%)	Proteína (%)		Lipídeos (%)		Cinzas (%)	
		B.U.	B.S.	B.U.	B.S.	B.U.	B.S.
Músculo	69,17 ± 0,87	16,26 ± 1,62	52,72 ^a ± 1,93	12,04 ± 0,09	39,05 ^c ± 0,31	1,46 ± 0,06	4,88 ^a ± 0,36
Resíduo	64,55 ± 0,81	10,58 ± 0,18	29,84 ^c ± 0,50	18,92 ± 0,18	53,39 ^a ± 0,51	1,57 ± 0,35	5,09 ^a ± 0,55
Resíduo após centrifugação	-	-	37,46 ^b ± 0,64	-	41,44 ^b ± 0,15	-	5,55 ^a ± 0,24

Todos os dados foram expressos como valores médios (média ± desvio padrão, n=4). B.U.: base úmida; B.S.: base seca.

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as amostras através do teste de Tukey (p<0,05; n=4).

As amostras apresentaram um conteúdo proteico em base seca de 52,72, 29,84 e 37,41%, de lipídios de 39,05, 53,39 e 41,44% e de cinzas de 4,88, 5,09 e 5,55%, para músculo, resíduo e resíduo desengordurado, respectivamente. O valor de proteína do músculo apresenta-se um pouco abaixo dos valores encontrados para o salmão e os valores de lipídios e cinzas foram um pouco maiores.

Ao compararmos os valores em base úmida para o músculo com a variação apresentada por Chuang, Lin e Shiau (2007, 2010) percebe-se que estes se encontram nesta faixa, mas salientando que a mesma é ampla.

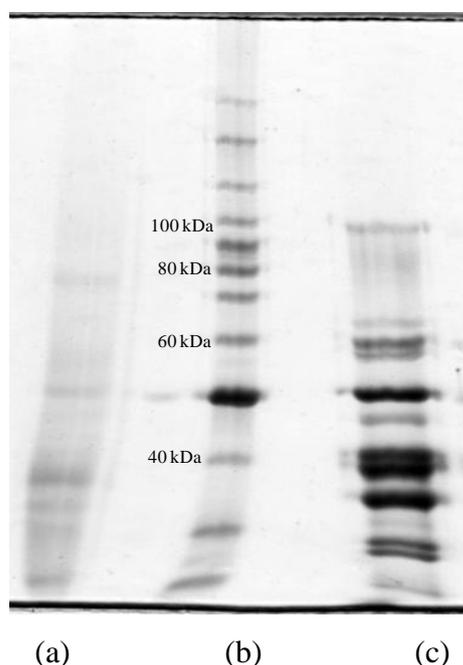
O teor de umidade do músculo de pescado está geralmente correlacionado negativamente com o teor de gordura, pois quando a carne do pescado acumula gordura seu nível de umidade tende a diminuir e vice-versa. Estes fenômenos têm sido demonstrados em vários trabalhos (DATA; YAMAMOTO, 1988; HIRANO; NAKAMURA; SUYAMA, 1980; MORISHITA et al., 1987; SHIAU et al., 1997) e estão de acordo com os resultados deste trabalho, onde o resíduo apresentou menor teor de umidade (64,55%) que o músculo (69,17%) e maior teor de gordura (18,92 e 12,04%, respectivamente).

O teor de lipídios apresentou-se elevado tanto no músculo quanto no resíduo, sendo esse um interferente no momento da hidrólise, principalmente pela adição de NaOH durante o processo o que pode causar uma reação de saponificação (ALLINGER, 1976). Foram realizados testes de hidrólise, em que não foi possível obtê-la com o resíduo devido ao seu alto teor lipídico, possivelmente ocorreu uma inibição enzimática devido à oxidação lipídica, como constataram Matsushita, Kobayashi e Nitta (1970), optando-se por retirar parte da

gordura do resíduo pelo processo físico de centrifugação, alternativo à extração com solvente (hexano) devido à possibilidade de aplicação em alimentos, alcançando-se uma redução de mais de 20% e, conseqüentemente, aumentou o teor proteico do resíduo que foi em torno de 25%. Facilitando e melhorando a qualidade da hidrólise com este substrato.

A Figura 8 apresenta o perfil eletroforético do resíduo e do músculo do bijupirá frente à um padrão que possui uma faixa entre 25 e 220 kDa (Figura 8b).

Figura 8 – Perfil de separação de proteínas por eletroforese. (a) resíduo; (b) padrão; (c) músculo.



A Figura 8a mostra que as proteínas do resíduo do bijupirá encontram-se abaixo de 80 kDa, no entanto as proteínas do músculo (Figura 8c) apresentam proteínas desde 100 kDa até abaixo de 25 kDa, não sendo possível determinar se haviam proteínas abaixo deste devido ao limite do método nestas condições. A maior parte das proteínas encontradas no músculo estão concentradas em aproximadamente 40 kDa concordando com o encontrado por Silva (2010) que, ao avaliar resíduos oriundos do processamento de tilápia (carcaça, exceto vísceras), encontrou um perfil eletroforético em que a maioria das proteínas se encontram em torno de 40 kDa, variando entre uma faixa de 6 a 200 kDa.

O resíduo apresentou proteínas de menor tamanho, quando comparado ao músculo devido ao processo autolítico que depende apenas da ação das enzimas digestivas naturais que ocorrem no próprio pescado (MOHR, 1980).

5.2 Obtenção dos hidrolisados proteicos de pescado

Juntamente com a caracterização da matéria prima foi realizada a determinação da atividade específica das enzimas (Apêndice 1) para ajustar os parâmetros de hidrólise, utilizando-se do teor de tirosina liberado e de proteína da mesma (Apêndices 2 e 3), e assim comparar mutuamente a atuação de cada enzima em cada substrato distinto, utilizando a mesma proporção em atividade enzimática por massa proteica do músculo ou resíduo. Com o mesmo objetivo, as enzimas endógenas contidas no músculo e no resíduo foram inativadas, para que facilitasse a ação das enzimas e não afetasse as características dos produtos resultantes e estes pudessem ser reproduzíveis (BENKAJUL et al., 1997; MARTINS; COSTA; PRENTICE, 2009; ROSSI 2007).

As reações de hidrólise tiveram o seu grau acompanhado durante o processo (Figuras 9 e 10). O estudo cinético do comportamento da hidrólise enzimática permite que se possa, a partir dos dados, determinar o produto a ser obtido, sendo possível produzir hidrolisados com perfil de peptídeos bem definido. Além disso, os hidrolisados enzimáticos apresentam alta funcionalidade e valor nutritivo quando comparados com os hidrolisados químicos, seja ácido ou alcalino (MARTINS; COSTA; PRENTICE, 2009).

Figura 9 – Cinética do grau de hidrólise de músculo de bijupirá utilizando as enzimas Alcalase, Flavourzyme e Protamex.

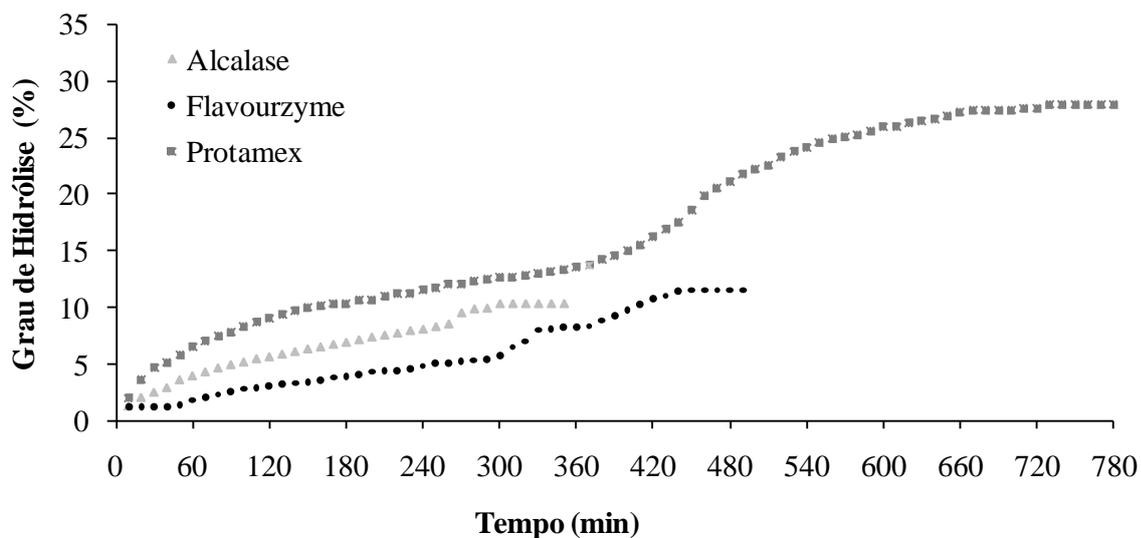
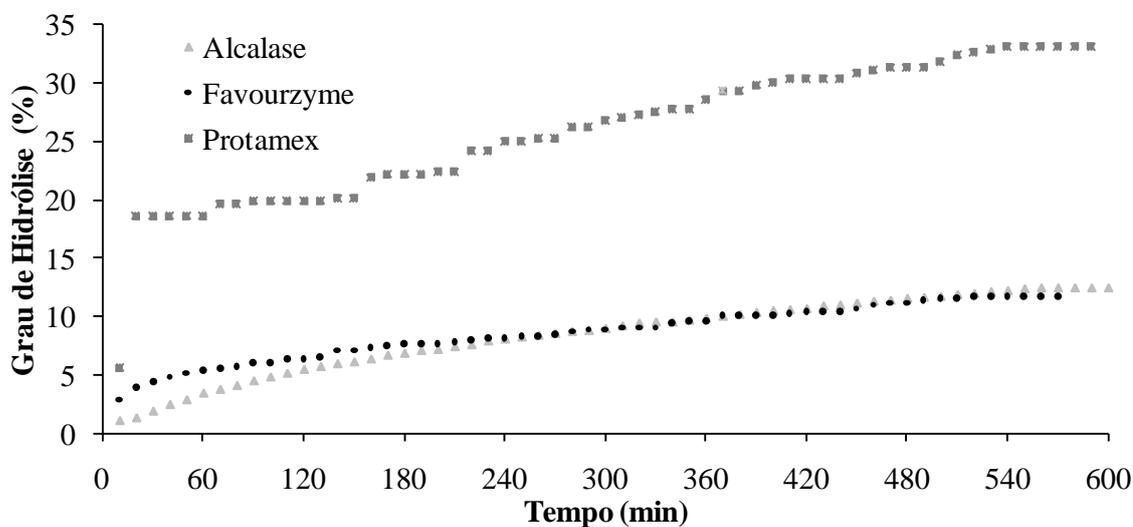


Figura 10 – Cinética do grau de hidrólise de resíduo de bijupirá utilizando as enzimas Alcalase, Flavourzyme e Protamex.



Foi possível verificar nas Figuras 9 e 10 que as curvas cinéticas obtidas apresentaram uma hidrólise intensa no início do processo com uma redução na sua taxa com o tempo, sendo um comportamento característico para esse tipo de reação já relatado por diversos autores (ADLER-NISSEN, 1979; CHEN; MURAMOTO; YAMAUCHI, 1995; MÁRQUEZ; VÁZQUEZ, 1999; NGUYEN et al., 2011), com exceção do músculo hidrolisado com Flavourzyme.

Segundo Kristinsson e Rasco (2000), a hidrólise enzimática das proteínas musculares é caracterizada por uma rápida fase inicial, durante a qual, várias ligações peptídicas são rompidas. A seguir, esta taxa de hidrólise decresce e atinge uma fase estacionária, na qual nenhuma hidrólise aparente ocorre. Möhr (1980) também defende a hipótese de que a reação global envolve pelo menos duas etapas. Na primeira, as moléculas de enzima se tornam associadas com as partículas de pescado. Posteriormente, a hidrólise ocorre, resultando na liberação de peptídeos solúveis e aminoácidos.

Pode ser observado nas Figuras 9 e 10 que após a adição da enzima houve uma rápida fase inicial durante a qual foi clivado um grande número de ligações peptídicas por unidade de tempo, e durante o qual uma grande proporção de material solúvel foi liberada para a solução (identificada pelo consumo de NaOH para ajuste do pH). Após as proteínas foram hidrolisadas lentamente, possivelmente, porque se encontram mais compactadas ou que possuem as cadeias mais volumosas próximas umas das outras causando o impedimento estérico (ZAHA; FERREIRA; PASSAGLIA, 2012), o que ocorreu concomitante com a redução do substrato disponível à medida que passou o tempo de reação.

Diniz e Martin (1997) estudando a hidrólise de proteínas de cação com a enzima Alcalase 2.4L sugeriram que o comportamento de diminuição constante da taxa de GH (Apêndices 5 e 6) observado durante o curso da hidrólise pode ser devido a uma desativação ou inibição da enzima por peptídeos inibitórios, que são continuamente solubilizados durante a hidrólise. Tal comportamento indicou também possível desativação da enzima ao longo do tempo, devido a uma baixa estabilidade em altas temperaturas (em torno de 45 °C) durante várias horas, incluindo a possibilidade de que a enzima se auto-hidrolisa. Esta observação, juntamente com os resultados obtidos permite concluir que a forma das curvas de hidrólise pode ser explicada como resultado da diminuição de ligações peptídicas disponíveis para a hidrólise combinados a uma desativação parcial da enzima durante o curso de hidrólise.

Ao compararmos as diferentes enzimas utilizadas para hidrolisar as proteínas do músculo (Figura 9) percebeu-se que o tempo e o GH para as enzimas Alcalase, Flavourzyme e Protamex (nesta ordem) foram: 300 min e 10,3%, 450 min e 11,5% e 730 min e 27,9%, respectivamente. Todas estas hidrólises apresentaram um segundo estágio de reação intensa. Esta característica é geralmente atribuída como um efeito de adição de enzima ou substrato (GUERARD et al., 2001), que pode ter ocorrido seja pela liberação de partes da proteína com maior capacidade de atuação da enzima, seja pela liberação de mais cofatores metálicos capazes de aumentar a quantidade de enzimas ativas.

A enzima Alcalase demonstrou menor capacidade de atuar sobre este substrato, quando comparado com as outras enzimas (Flavourzyme e Protamex) devido à apresentar um grau menor. Piotrowicz (2012) ao hidrolisar carne mecanicamente separada de anchoíta na proporção de 1,0% m/m (enzima/proteína) em tempos fixos de 1 e 5 h obteve um GH maior com a enzima Alcalase que com as enzimas Flavourzyme e Protamex, chegando a cerca de 80% no maior tempo. Visto que neste trabalho foi utilizado dez vezes menos enzima com relação ao substrato, poderia ser explicada essa diferença de quase dez vezes. Em ambos os tempos esta apresentou maior atividade que Flavourzyme e Protamex, porém vale salientar que as atividades das enzimas não foram medidas não sendo comparáveis entre si, assim como não se identificou o término do processo no trabalho citado. Em 270 min (4,5 h) de proteólise do músculo com Alcalase o GH apresentou uma elevação mais intensa com uma taxa de três a quatro vezes maior do que os outros tempos (Apêndice 5).

Na Figura 9 é possível perceber que a enzima Flavourzyme apresentou uma dificuldade em hidrolisar as proteínas do músculo ao início do processo, sendo que nos 10 min de processo alcançou 1,14% de GH, estabilizando com taxa zero de hidrólise por 30 min. Em outros momentos (entre 110 e 160, 180 e 190, 210 e 230, 260 e 290, 340 e 370 min) se

pode perceber que existem taxas bem próximas de zero, enquanto em outros há picos de intensidade, onde o mais proeminente se encontra na faixa de 310 e 330 min (Apêndice 5). Nesta oscilação acredita-se como hipótese de que a enzima Flavourzyme, por ser uma EC 3.4.11.1 (NC-IUBMB, 1992), tenha clivado as leucinas localizadas nas extremidades N-terminal nos primeiros 10 min, tornando a reação estável até passar a romper as ligações extremas que apresentem outros aminoácidos, os quais têm menos capacidade de atuação. Após, começar a buscar novamente por ligações de leucina N-terminal que tenham sido liberados durante a hidrólise, este comportamento pode ter se repetido várias vezes até que a enzima tenha perdido a atividade, ou algum outro fator, já citado, possa ter influenciado a atuação da mesma (DINIZ; MARTIN, 1997).

Também é importante salientar o impacto da especificidade da enzima, que é um fator chave que influencia as características dos hidrolisados e a natureza e composição dos peptídeos produzidos. A proteólise pode ocorrer sequencialmente, liberando um peptídeo de cada vez, ou através da formação de intermediários que são ainda hidrolisados até peptídeos menores conforme progride a hidrólise, o que é muitas vezes denominado "mecanismo zipper" (PANYAM; KILARA, 1996). Este fenômeno pode ter ocorrido durante esta hidrólise.

Silva, Fonseca e Prentice (2014) ao hidrolisarem ossos desmineralizados de corvina nas mesmas condições obtiveram um comportamento inicial semelhante ao encontrado neste trabalho, demonstrando que pode ser uma característica importante de atuação da enzima que está fortemente associado ao tipo de substrato.

A enzima Protamex durante a proteólise do músculo forneceu outro aumento intenso de GH nos 400 min (Apêndice 5). Esta enzima tem como característica ser uma endoprotease com afinidade por mais de um tipo de ligação, portanto o comportamento percebido pode ter ocorrido devido à capacidade de interagir com estas ligações, visto que poderia atuar nos aminoácidos serina, leucina e fenilalanina, sendo que para romper estes dois últimos possui a necessidade de um cofator metálico que modificaria a conformação da enzima de forma iônica e, provavelmente, perdendo a afinidade com a serina (NC-IUBMB, 1992). Conseqüentemente, o que pode ter sucedido é que em um momento a enzima estaria ligada ao cofator e em outro momento estaria sem a presença do mesmo, explicando assim o dubio comportamento.

As hidrólises das proteínas dos resíduos (Figura 10) tiveram tempo e GH para as enzimas Alcalase de 560 min e 12,5%, Flavourzyme de 520 min e 11,7% e Protamex de 540 min 33,1%. Todos não demonstraram uma segunda reação intensa ao longo do processo e apresentaram um tempo de reação semelhante. Provavelmente por este substrato apresentar

proteínas menores e/ou parcialmente hidrolisadas e/ou cadeias mais abertas (estruturas quaternária e terciária) pelas enzimas endógenas presentes em maior abundância nas vísceras como demonstrado através da eletroforese (Figura 8).

Silva, Fonseca e Prentice (2014) estudaram diferentes fontes protéicas provenientes da corvina e, ao utilizar as enzimas Alcalase, Flavourzyme e Protamex, nas mesmas condições de hidrólise utilizadas neste trabalho, encontraram, respectivamente, um GH de 6,0, 5,9 e 30,5% para o isolado proteico e de 14,7, 15,5 e 21,5% para os ossos desmineralizados. Os ossos desmineralizados demonstraram ter proteínas as quais as enzimas testadas possuem maior capacidade de atuação, do que o isolado proteico. A enzima Protamex, apresentou maior GH para os dois substratos testados, quando comparados com as enzimas Alcalase e Flavourzyme. Este estudo, juntamente com os resultados obtidos neste trabalho demonstra que entre cada substrato e cada enzima existem comportamentos diferentes e, portanto, devem ser avaliados os parâmetros cinéticos para cada hidrolisado.

Dependendo da especificidade da enzima, das condições e do GH, uma grande variedade de peptídeos será gerada. O hidrolisado proteico resultante vai possuir as propriedades peculiares de acordo com os novos peptídeos gerados (GUERARD; GUIMAS; BINET, 2002). Segundo conceitos levantados por Pedroche et al. (2004) todos os hidrolisados obtidos neste estudo podem ser considerados com GH superior sendo indicados para uso em alimentos para fins especiais, assim como tem maior probabilidade de apresentarem alguma bioatividade, o que justificou o uso de diferentes enzimas e substrato para realizar a investigação quanto a atividade antioxidante dos mesmos. Em síntese, a enzima Protamex foi a que demonstrou maior capacidade de hidrolisar o substrato proteico oriundo do músculo e do resíduo do bijupirá devido ao maior GH fornecido pela mesma.

5.3 Teor de proteína solúvel medida em tirosina

Os teores de proteína solúvel medida em tirosina foram determinados no início e no fim para obtenção da porcentagem de liberação da mesma (Tabela 2).

Tabela 2 – Percentual de proteína solúvel em tirosina dos hidrolisados proteicos do músculo e resíduo do bijupirá pelas enzimas Alcalase, Flavourzyme e Protamex.

Enzima	Proteína solúvel- tirosina (%)	
	Músculo	Resíduo
Alcalase	2,15 ^{bd} ± 0,08	8,46 ^{aA} ± 0,10
Flavourzyme	2,25 ^{bd} ± 0,05	2,63 ^{cC} ± 0,06
Protamex	6,47 ^{aB} ± 0,17	6,46 ^{bB} ± 0,33

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as amostras e maiúsculas indicam diferenças significativas entre todos os resultados através do teste de Tukey (p<0,05; n=4).

Ao analisar os resultados de GH expostos anteriormente (Figuras 9 e 10) e os teores de proteína solúvel em tirosina (Tabela 2), é verificado que os mesmos praticamente podem estar diretamente correlacionados, por apresentarem maiores teores de proteína solúvel (tirosina) os que tiveram maior GH, como os hidrolisados de bijupirá com a enzima Alcalase produzidos por Amiza, Kong e Faazaz (2012) que determinaram a composição de aminoácidos dos hidrolisados e obtiveram a porcentagem de tirosina de 0,55, 0,59 e 0,74 para os respectivos GHs (%) de 53,42, 70,81 e 95,63.

Porém para o resíduo hidrolisado com Alcalase não ocorreu essa proporcionalidade. Esses valores são dependentes dos aminoácidos (tipos e posição) presentes no substrato, além da forma como atua cada enzima (CLEMENTE, 2000). A endoproteínase Alcalase possui especificidade e forte capacidade de hidrólise, sendo capaz de liberar aminoácidos livres, o que pode ter explicado esse comportamento distinto dos demais neste hidrolisado. As propriedades de cada enzima fazem com que forneçam diferentes produtos para o mesmo substrato ou com o mesmo substrato, diferentes características para enzimas diferentes.

As endopeptidases hidrolisam as ligações peptídicas nas moléculas de proteína de forma aleatória para produzir peptídeos relativamente grandes. Exoproteases sistematicamente removem os aminoácidos do N-terminal ou no C-terminal ou por hidrólise de peptídeos nas ligações terminais (CLEMENTE, 2000).

A Alcalase é uma enzima alcalina que possui especificidade e forte capacidade de hidrólise, onde o principal componente da enzima, Subtilisina A (Subtilisin Carlsberg) é uma endoproteínase sendo capaz de quebrar as ligações peptídicas e, com isso, diminuir a massa molar e melhorar as propriedades funcionais de proteínas, além da formação de aminoácidos livres em hidrolisados proteicos (YANG et al., 2011), o que pode explicar o alto teor de tirosina no resíduo hidrolisado por esta enzima. Enquanto a Flavourzyme é um complexo de

proteases fúngicas, constituída de exopeptidases e endopeptidases, atuando na hidrólise sob condições neutras ou ligeiramente ácidas, assim como a Protamex é uma protease bacteriana, sendo complexa pela mistura de endo e exopeptidases.

Em outro trabalho (SILVA; FONSECA; PRENTICE, 2014) não houve a proporcionalidade de GH com o teor de proteína solúvel determinada como tirosina para os hidrolisados de ossos desmineralizados e isolado proteico de corvina. Foram utilizadas as enzimas Alcalase, Flavourzyme e Protamex, apresentando maior valor de proteína solúvel (tirosina) com a Flavourzyme para os ossos desmineralizados e Protamex para o isolado proteico, sendo os GHs maiores com a enzima Protamex para ambos os substratos, concordando com o exposto anteriormente.

Dentre os aminoácidos que podem ser obtidos por hidrólise, destacamos a tirosina, um aminoácido não essencial encontrado em grandes quantidades em alimentos de origem animal e vegetal, por ser o precursor metabólico para a síntese dos neurotransmissores catecolamina, norepinefrina e dopamina, no sistema nervoso central e periférico. A disponibilidade de tirosina pode ser um fator limitante para o bom funcionamento do sistema nervoso central. Por conseguinte, a suplementação de tirosina na dieta pode reduzir alguns dos efeitos adversos do estresse e ativação do sistema nervoso central (NERI et al., 1995; THOMAS et al, 1999).

A determinação de proteína solúvel em tirosina é importante como um parâmetro indireto para demonstrar se houve hidrólise e o quanto desse aminoácido foi liberado. Alguns autores ao produzirem peptídeos bioativos atribuem à presença da tirosina na sequência à atividade antioxidante. Jun et al. (2004) ao hidrolisarem carcaça de atum amarelo e purificar a fração com maior potencial bioativo encontraram o peptídeo com 10 resíduos, Arg-Pro-Asp-Phe-Asp-Leu-Glu-Pro-Pro-Tyr, com 13 kDa, o qual a tirosina terminal é a maior responsável pela atividade antioxidante (métodos do sistema modelo do ácido linoleico, poder redutor e TBA, frente ao α -tocoferol como controle), por ser um potente doador de hidrogênio. No trabalho de Je, Park e Kim (2005) foi obtida a sequência peptídica Leu-Pro-His-Ser-Gly-Tyr com massa molar de 672 Da, ao hidrolisar ossos de polaca do Alasca e atribuem a atividade antioxidante (métodos do sistema modelo do ácido linoleico e poder redutor, frente ao α -tocoferol como controle) à tirosina terminal (por ser doadora de hidrogênio) e a histidina na sequência (pelo seu anel imidazol) na molécula.

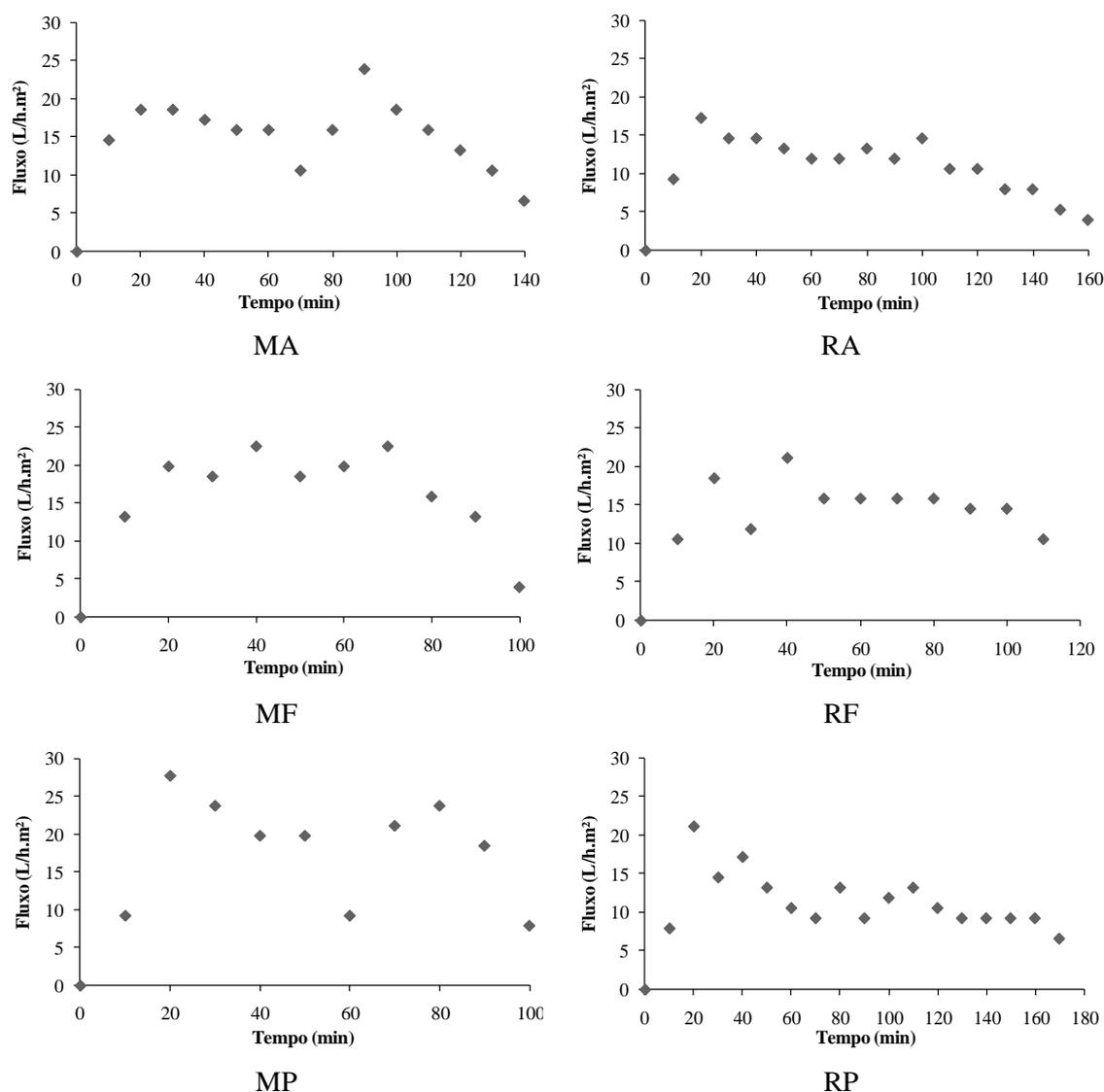
O hidrolisado proteico obtido do resíduo do bijupirá sob ação da enzima Alcalase apresentou maior conteúdo de proteína solúvel (tirosina) diferindo estatisticamente dos

demais, seguido dos hidrolisados com Protamex (músculo e resíduo), que demonstraram ser iguais entre si, ao nível de 5% de significância.

5.4 Obtenção das frações peptídicas dos hidrolisados

Todos os hidrolisados foram submetidos à ultrafiltração (UF) utilizando membranas com *cut-off* de 3 kDa. Foram obtidas frações peptídicas maiores e menores que 3 kDa. O fluxo foi acompanhado durante o processo (Figura 11) em que o volume do permeado foi coletado e medido a cada 5 min (Apêndice 7), assim que o fluxo reduziu, apresentando um volume médio de retentado de 33 mL para o músculo e 17 mL para o resíduo, foi cessada a filtração para que a pressão não interferisse na facilitação da passagem de moléculas maiores que o poro. A partir da UF o número de amostras para as posteriores análises triplicou, totalizando em 18 amostras: 6 integrais, 6 maiores que 3 kDa e 6 menores que 3 kDa.

Figura 11 – Cinética da ultrafiltração para os hidrolisados de músculo e resíduo do bijupirá pelas enzimas Alcalase, Flavourzyme e Protamex.



Onde MA – hidrolisado do músculo com Alcalase; MF – hidrolisado do músculo com Flavourzyme; MP – hidrolisado do músculo com Protamex; RA – hidrolisado do resíduo com Alcalase; RF – hidrolisado do resíduo com Flavourzyme; e RP – hidrolisado do resíduo com Protamex.

Os processos de separação das frações e obtenção do permeado (menor que 3 kDa) e retentado (maior que 3 kDa) levaram mais de 100 min. Este tempo elevado pode ter ocorrido pela baixa temperatura utilizada durante o processo, visto que quanto maior a temperatura menor é o tempo de permeação (BORSEAU et al., 2009; NOGUEIRA; VENTURINI FILHO, 2004), no entanto, temperaturas altas poderiam desnaturar ou reduzir o potencial antioxidante dos hidrolisados proteicos.

O fluxo de permeação da UF foi reduzindo de acordo com o tempo, ao analisar os gráficos da Figura 11 pode-se notar que nos últimos 15-20 min houve uma redução do fluxo

que variou de 33 a 88%. Este fluxo diminui à medida que a concentração de solutos aumenta, devido a dois mecanismos (CHERYAN, 1998); seja pelo aumento da pressão osmótica pelo aumento da concentração do soluto na superfície da membrana causando uma redução da força motriz (mesmo que a pressão osmótica da solução de alimentação seja muito baixa, o aumento da concentração na parede de membrana pode ser muito importante e a pressão osmótica pode tornar-se não negligenciável); seja pelo aumento da resistência hidrodinâmica da camada limite, quando a resistência em série, ocorre normalmente ao utilizar hidrocolóides, macromoléculas (como proteínas) e outros solutos de estrutura molar grande. Estes componentes, sendo largamente rejeitados pela membrana, tendem a formar uma camada na superfície da membrana que, dependendo do tipo de sólidos, pode ser viscosa ou gelatinosa.

Pode se perceber na Figura 11 que nas UF dos hidrolisados de músculo houve uma maior taxa no início do processo e menor tempo total de filtração havendo um declínio mais intenso no final com um volume maior de retentado no término, quando comparado aos hidrolisados de resíduo, essa característica pode ter ocorrido por alguma incrustação devido ao alto fluxo inicial.

Na tentativa de se obter um parâmetro para reutilização das membranas de UF foram obtidas microfotografias (Apêndice 8) para avaliar as membranas novas, com um uso e uma reutilização (segundo uso). Porém, o único que se pode observar é que nas membranas novas existem ranhuras mais evidentes, quando comparadas as outras já utilizadas e que o material depositado nas mesmas se apresenta em maior quantidade quanto maior o número de usos das membranas. No entanto, estas observações não são conclusivas para se determinar a possibilidade de reuso ou o descarte das mesmas.

5.5 Determinação de grupos sulfidril

O grupo sulfidril (SH) está presente no aminoácido cisteína, resíduos deste são muito importantes, uma vez que podem atuar diretamente com radicais, atuando como sequestrador (PATTERSON; RHOADES, 1988), e também facilitando a atividade antioxidante da glutathione (SELVAM; DEVARAJ, 1996) ao proteger os tecidos contra o estresse oxidativo (SARMADI; ISMAIL, 2010). A cisteína neste caso possui um grupo tiol antioxidante que pode sequestrar os radicais peroxil doando elétrons e/ou hidrogênio através de interconversões entre os grupos sulfidril e dissulfeto (ATMACA, 2004) e, como reportado por Harman,

Mottley e Mason (1984), este grupo tem um papel muito importante na proteção de células e biomoléculas de estresse oxidativo.

Na Tabela 3 está apresentado o teor de grupos sulfidrila presente nos hidrolisados proteicos integrais e após fracionamento (frações peptídicas maiores e menores de 3 kDa).

Tabela 3 – Teor de grupos sulfidrila dos hidrolisados de músculo e resíduo do bijupirá pelas enzimas Alcalase, Flavourzyme e Protamex, integrais e frações peptídicas maiores e menores que 3 kDa.

Amostras	Teor de grupos sulfidrila ($\mu\text{mol SH/g}$ proteína)		
	Integral	> 3 kDa	< 3 kDa
MA	4,64 ^{dB} \pm 0,01	10,96 ^{dA} \pm 0,90	4,56 ^{bcB} \pm 0,09
MF	10,14 ^{cB} \pm 0,45	25,83 ^{bA} \pm 1,00	2,77 ^{cdC} \pm 0,06
MP	4,95 ^{dA} \pm 0,81	4,86 ^{eA} \pm 0,14	1,29 ^{dB} \pm 0,07
RA	8,11 ^{cB} \pm 0,72	12,56 ^{cdA} \pm 0,89	3,42 ^{cdC} \pm 0,03
RF	14,26 ^{bA} \pm 1,06	14,60 ^{cA} \pm 0,82	6,76 ^{abB} \pm 0,80
RP	18,88 ^{aB} \pm 0,37	41,43 ^{aA} \pm 0,42	7,37 ^{aC} \pm 0,73

MA – hidrolisado do músculo com Alcalase; MF – hidrolisado do músculo com Flavourzyme; MP – hidrolisado do músculo com Protamex; RA – hidrolisado do resíduo com Alcalase; RF – hidrolisado do resíduo com Flavourzyme; e RP – hidrolisado do resíduo com Protamex.

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna e maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre as amostras através do teste de Tukey ($p < 0,05$; $n=3$).

Analisando os resultados de grupos SH dos hidrolisados integrais com os GHs percebe-se que não há correlação entre eles. A partir da Tabela 3 pode-se verificar que ao compararmos as amostras entre si (integrais, maiores ou menores que 3 kDa) a que forneceu maior teor de grupos SH foi o RP 18,88, 41,43 e 7,37 $\mu\text{mol SH/g}$ proteína, respectivamente em cada fração. Silva (2014) ao analisar o teor de grupos sulfidrila de hidrolisados de isolado proteico e ossos desmineralizados de corvina com as mesmas enzimas deste trabalho, em frações maiores e menores que 3 kDa, encontrou que a enzima Protamex forneceu resultados superiores que as demais enzimas, seguidos da Flavourzyme e Alcalase, nesta ordem, porém os hidrolisados de ossos desmineralizados na fração menor que 3 kDa não apresentou diferença entre as enzimas.

Considerando o músculo percebe-se que para o integral e para a fração maior que 3 kDa tem-se o maior valor para o hidrolisado com Flavourzyme (10,14 e 25,83 $\mu\text{mol SH/g}$

proteína), porém para a fração menor que 3 kDa o que forneceu maior valor foi o hidrolisado com Alcalase (4,56 $\mu\text{mol SH/g}$ proteína).

O fracionamento demonstrou que as frações peptídicas maiores que 3 kDa são as que apresentam maior proporção de grupos SH diferindo da amostra integral e menor que 3 kDa em todas as amostras, exceto para o RP que não demonstrou diferença entre o integral e a fração maior que 3 kDa.

Para a mesma enzima, comparando entre músculo e resíduo, apenas para a Flavourzyme maior que 3 kDa e Alcalase menor que 3 kDa as proteínas do músculo hidrolisadas forneceram maior teor de grupos SH. Assim, ao comparar a atuação das enzimas frente à origem do substrato, os resultados dos hidrolisados integrais apresentados na Tabela 3 indicam que, provavelmente, o resíduo do bijupirá apresenta maior teor de cisteína que o seu músculo.

Pihlanto (2006) relata a presença de micro e macronutrientes antioxidantes no leite e soro e atribui a função de eliminação de radicais livres por aminoácidos, tais como a tirosina e cisteína. Entre muitos dos aminoácidos presentes na κ -caseína, a cisteína parece desempenhar um papel importante na capacidade de absorção do radical peróxido ($\text{ORAC}_{\text{ROO}^*}$) dos caseinofosfopeptídeos obtidos de caseína hidrolisada com Alcalase (KIM; JANG; KIM, 2007). Roman e Sgarbieri (2007) encontraram para o isolado proteico de soro de leite bovino comercial valores em torno de 30 $\mu\text{mol SH/g}$ proteína, considerando que derivados do leite, principalmente o soro, são uma fonte importante de cisteína. Podemos verificar que as proteínas do resíduo do bijupirá hidrolisadas pela enzima Protamex são promissoras quanto ao fornecimento deste aminoácido.

Da mesma forma, neste trabalho foram demonstrados resultados maiores de grupo SH que outras fontes protéicas como podem ser citados o hidrolisado de músculo do pescado castanha e de músculo de frango, ambos com Flavourzyme, com valores respectivos 4,7 e 2,7 $\mu\text{mol SH/g}$ proteína, esta enzima forneceu melhor desempenho na liberação deste aminoácido em comparação com as outras enzimas utilizadas, Tripsina e α -Quimotripsina (CENTENARO, 2011), no entanto os valores encontrados por Silva (2014) são muito superiores variando de 304,00 a 731,40 $\mu\text{mol SH/g}$ de proteína para hidrolisados de ossos desmineralizados e de isolado proteico de corvina fracionados em diferentes tamanhos, os quais os maiores valores foram dados pelas amostras submetidas a atuação da enzima Protamex frente a Flavourzyme e Alcalase. Isto demonstra que esta enzima tem maior capacidade de liberar a cisteína, possivelmente pela característica de ser uma endo e

exoprotease com habilidade de cindir ligações de pontes dissulfeto entre duas cistinas (GILBERT; MC LEAN, 1990).

A cisteína também é considerada um aminoácido limitante na síntese de glutathione, tripeptídeo este, o qual o sítio ativo está no grupo SH, é considerado um sistema de defesa antioxidante dentro de células, protegendo-as contra a lesão resultante da exposição a agentes como íons ferro, oxigênio hiperbárico, ozônio, radiação e luz ultravioleta, ainda participa da detoxificação de agentes químicos e da eliminação de produtos da lipoperoxidação, entre outras (DENEKE; FANBURG, 1989; FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Portanto, pode ser considerado um antioxidante de forma direta e indireta, atuando como um protetor de agentes pró-oxidantes.

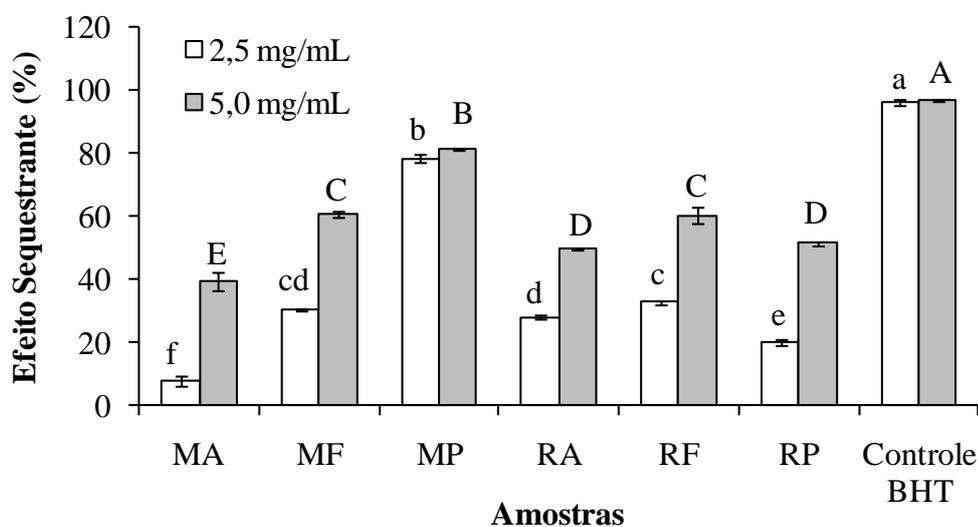
Portanto, analisando todos os resultados da Tabela 3 se identifica que a fração maior que 3 kDa do RP com 41,43 $\mu\text{mol SH/g}$ proteína é o que detém o maior conteúdo de grupos SH, remetendo ao maior teor do aminoácido cisteína.

5.6 Determinação da atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos

5.6.1 Sequestro do radical DPPH•

Nas Figuras 12, 13 e 14 estão os resultados de sequestro do DPPH• para os hidrolisados integrais e as frações peptídicas maiores e menores que 3 kDa, onde o método utilizado se baseia na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um radical livre, o DPPH•, que ao se reduzir perde sua coloração púrpura. Desta forma, avalia apenas o poder redutor do antioxidante, que ao doar um elétron se oxida, e por este motivo não detecta substâncias pró-oxidantes (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006). As análises foram realizadas em momentos disitintos, portanto são apresentados valores diferentes para o controle.

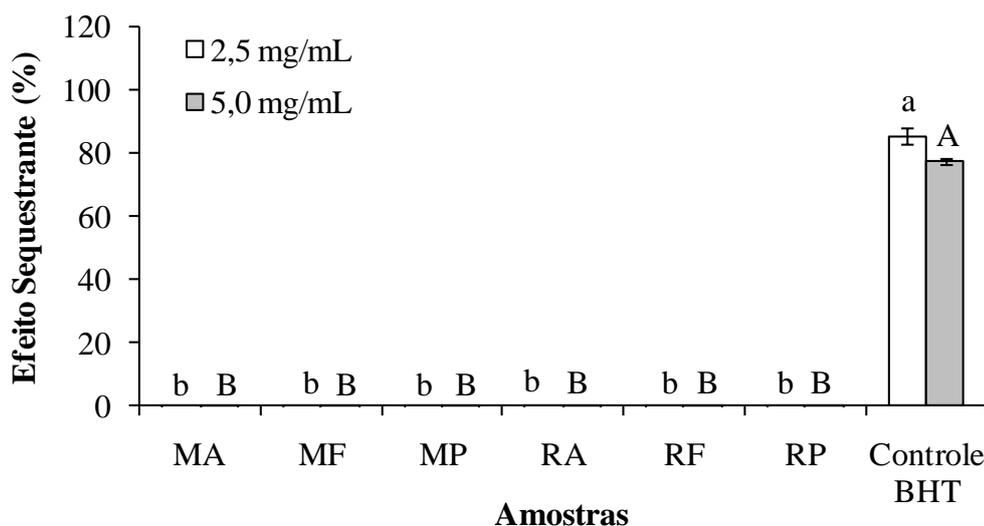
Figura 12 – Efeito sequestrante de DPPH relativo ao branco dos hidrolisados de músculo e resíduo de bijupirá com Alcalase, Flavourzyme e Protamex integrais.



MA – hidrolisado do músculo com Alcalase; MF – hidrolisado do músculo com Flavourzyme; MP – hidrolisado do músculo com Protamex; RA – hidrolisado do resíduo com Alcalase; RF – hidrolisado do resíduo com Flavourzyme; e RP – hidrolisado do resíduo com Protamex.

Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as amostras de concentração 2,5 mg/mL (minúsculas) e 5,0 mg/mL (maiúsculas) através do teste de Tukey ($p < 0,05$; $n=3$).

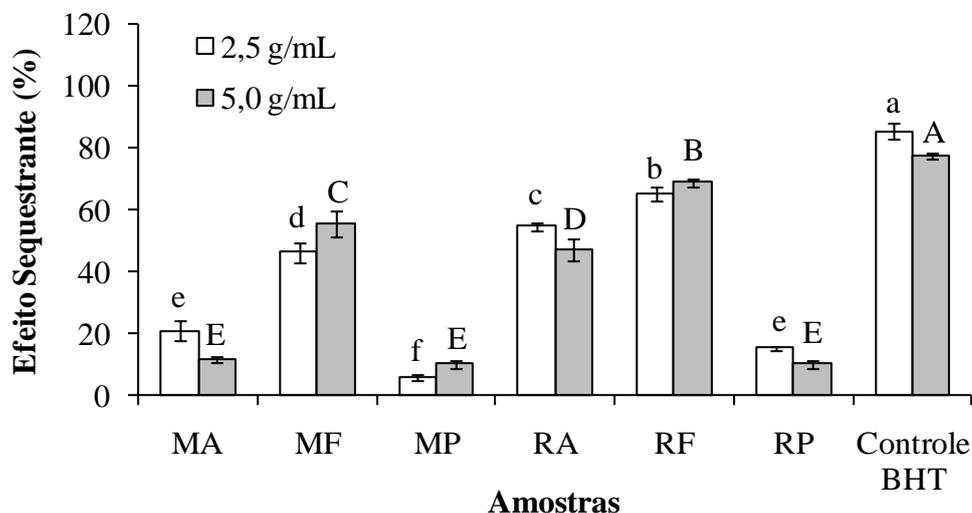
Figura 13 – Efeito sequestrante de DPPH relativo ao branco dos hidrolisados de músculo e resíduo de bijupirá com Alcalase, Flavourzyme e Protamex nas frações peptídicas maiores que 3 kDa.



MA – hidrolisado do músculo com Alcalase; MF – hidrolisado do músculo com Flavourzyme; MP – hidrolisado do músculo com Protamex; RA – hidrolisado do resíduo com Alcalase; RF – hidrolisado do resíduo com Flavourzyme; e RP – hidrolisado do resíduo com Protamex.

Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as amostras de concentração 2,5 mg/mL (minúsculas) e 5,0 mg/mL (maiúsculas) através do teste de Tukey ($p < 0,05$; $n=3$).

Figura 14 – Efeito sequestrante de DPPH relativo ao branco dos hidrolisados de músculo e resíduo de bijupirá com Alcalase, Flavourzyme e Protamex nas frações peptídicas menores que 3 kDa.



MA – hidrolisado do músculo com Alcalase; MF – hidrolisado do músculo com Flavourzyme; MP – hidrolisado do músculo com Protamex; RA – hidrolisado do resíduo com Alcalase; RF – hidrolisado do resíduo com Flavourzyme; e RP – hidrolisado do resíduo com Protamex.

Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as amostras de concentração 2,5 mg/mL (minúsculas) e 5,0 mg/mL (maiúsculas) através do teste de Tukey ($p < 0,05$; $n = 3$).

A avaliação da atividade antioxidante pelo mecanismo de sequestro do radical DPPH• é um dos parâmetros para determinar o potencial de uma substância em inibir a oxidação. Para verificar esse potencial, todas as amostras testadas foram relacionadas ao branco, onde se pode perceber que o controle BHT foi o que apresentou maior capacidade de sequestro deste radical, diferindo estatisticamente dos hidrolisados ao nível de 5% de significância.

Dentre os hidrolisados estudados, integrais e frações peptídicas maiores e menores que 3 kDa, é possível relatar que as frações maiores que 3 kDa (Figura 13) não apresentaram capacidade de sequestro do radical DPPH•. Este comportamento evidencia que cada método avalia a atividade antioxidante por mecanismos diferentes, pois ao correlacionarmos os resultados das Figuras 12, 13 e 14 juntamente com a Tabela 3, verificou-se que as amostras que obtiveram maior teor de grupos SH não foram as que tiveram maior capacidade de sequestrar o radical DPPH•, logo, a habilidade da cisteína em absorver radicais peróxido não pode ser extrapolada a outros radicais, assim como a posição do aminoácido na sequência peptídica também é uma característica relevante.

Um dos indicativos é o caráter hidrofóbico de peptídeos derivados de fontes de proteínas, que tem mostrado que se correlacionam com maior capacidade de sequestro do

DPPH• ou outras atividades de eliminação de radicais quando em comparação com as frações peptídicas de menor teor hidrofóbico (LI et al., 2008; ZHU; ZHOU; QIAN, 2006). Kim, Je e Kim (2007) relataram que os aminoácidos hidrofóbicos atuam como antioxidantes, aumentando a solubilidade dos peptídeos em ambientes não-polares facilitando assim uma melhor interação com os radicais livres.

Também o GH (Figuras 9 e 10) neste trabalho não foi um parâmetro adequado para prever o potencial dos hidrolisados em capturar o radical DPPH• (Figura 12), já que somente para o músculo houve esta relação, no entanto para o resíduo não, logo não é possível determinar o potencial em sequestrar o radical DPPH• apenas pelo GH. Este foi relatado em um trabalho realizado com concentrado proteico de soro de leite hidrolisado por diferentes enzimas, Kamal e Lu (2011) encontraram que o GH, embora benéfico onde as frações de baixa massa molar são requeridas, não necessariamente resultam em alta atividade antioxidante, analisado através do método de sequestro do radical DPPH•.

Outra característica importante é a concentração do possível antioxidante. As amostras que apresentaram maior potencial de sequestro (BHT, MP integral e RF menor que 3 kDa) foram também as que não demonstraram a influência das doses estudadas (2,5 e 5,0 mg/mL), provavelmente porque estão acima da dose que possui atividade máxima. Outras ainda não apresentaram aumento de sequestro com o aumento da concentração (MA e RP menores que 3 kDa), ao contrário demonstraram redução do mesmo. Este pode ter ocorrido devido à cinética da reação ser mais lenta, pois diferentes compostos apresentam tempos de reação distintos (BONDET; BRAND-WILLIAMS; BERSSET, 1997).

Ao separarmos as frações peptídicas espera-se que uma destas apresente maior potencial quando comparadas aos hidrolisados integrais, porém pode-se perceber que a amostra MP teve suas frações com menor atividade, possivelmente por haver um efeito sinérgico entre as frações menores e maiores atuando em conjunto.

Centenaro, Mellado e Prentice (2011) testaram a capacidade de sequestro do radical DPPH• de ossos do pescado castanha e frango hidrolisados por Flavourzyme, α -Quimotripsina e Tripsina, em que ambos os substratos sob atuação da enzima Flavourzyme foram as que apresentaram maiores valores, chegando a cerca de 25% de atividade sequestrante com 5 mg/mL. Cheung et al. (2012) ao hidrolisar filés de pescado do pacífico com 10 diferentes enzimas obtiveram valores entre 18 e 30% de sequestro deste radical utilizando 1 mg/mL de amostra, sendo a enzima Umamizyme-K a que forneceu o maior resultado. Já Bougateg et al. (2010) encontraram valores que variam de 10 a 53% de sequestro

com 2 mg/mL para hidrolisados de sub-produtos de sardinha com diferentes enzimas, a qual a que apresentou maior valor foi o obtido com extrato enzimático cru de vísceras de sardinha.

Alves (2010) expõe que compostos menores tem maior acesso ao sítio do radical DPPH•, uma forma de poder esclarecer porque as maiores capacidades de sequestro neste trabalho foram apresentadas pelos hidrolisados integrais (mistura de diversos tamanhos de cadeias peptídicas) e nas frações peptídicas menores que 3 kDa.

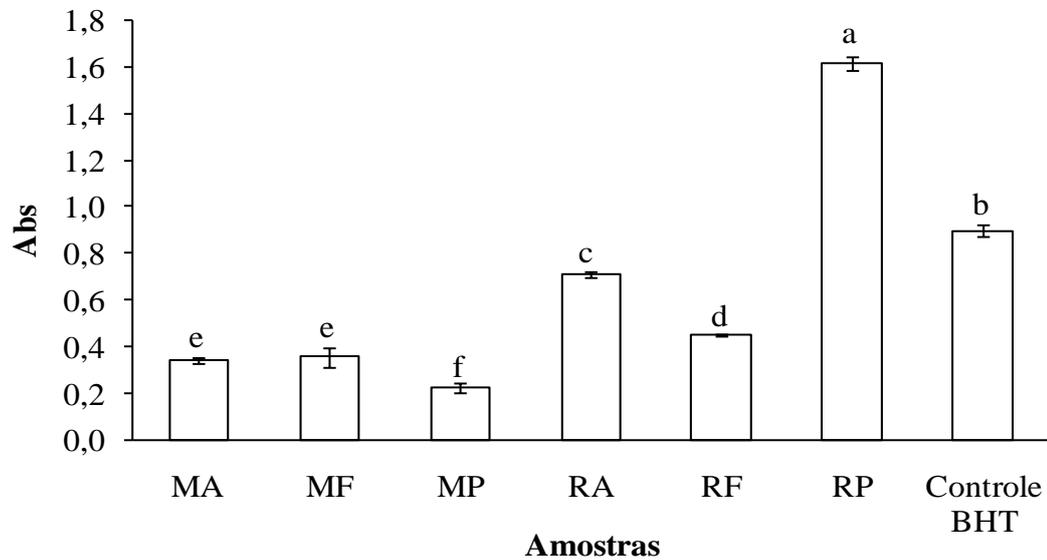
Dentre todos os hidrolisados estudados os que apresentaram maior potencial em sequestrar o radical DPPH• foram o MP integral com 78,35 e 81,35% e o RF menor que 3 kDa com 64,97 e 68,89% para os respectivos 2,5 e 5,0 mg/mL, que avaliados pelo teste de Tukey a 95% de confiança demonstra que a concentração não interferiu nestes hidrolisados, sugerindo uma aplicação com a menor concentração para esta amostra.

Contudo, ao observar os resultados deste trabalho juntamente com os dos autores citados verifica-se que para cada substrato e para cada enzima foram obtidas cadeias peptídicas distintas que, conseqüentemente, possuem diferente capacidade sequestrante. Para elucidar melhor o mecanismo seria necessário identificar a interação do radical com a seqüência peptídica. Concordando com Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) observou-se que a interação de um potencial antioxidante com o DPPH depende, sobretudo, de sua conformação estrutural e do número de grupos hidroxílicos disponíveis. Entretanto, para as substâncias testadas o mecanismo parece ser muito mais complexo, necessitando de um estudo posterior.

5.6.2 Poder Redutor

O poder redutor é indicado pelo aumento da absorbância dado pela capacidade de transferir elétrons, reduzindo os radicais livres e fornecendo uma estimativa de atividade antioxidante (FERREIRA et al., 2007; OYAIZU, 1986; SUN; TANUMIHARDJO, 2007; YEN; CHEN, 1995). Todos os hidrolisados, integrais e as frações peptídicas maiores e menores que 3 kDa, foram avaliados quanto ao poder redutor e os resultados estão apresentados nas Figuras 15, 16 e 17, respectivamente. As análises foram realizadas em momentos disitintos, portanto são apresentados valores diferentes para o controle

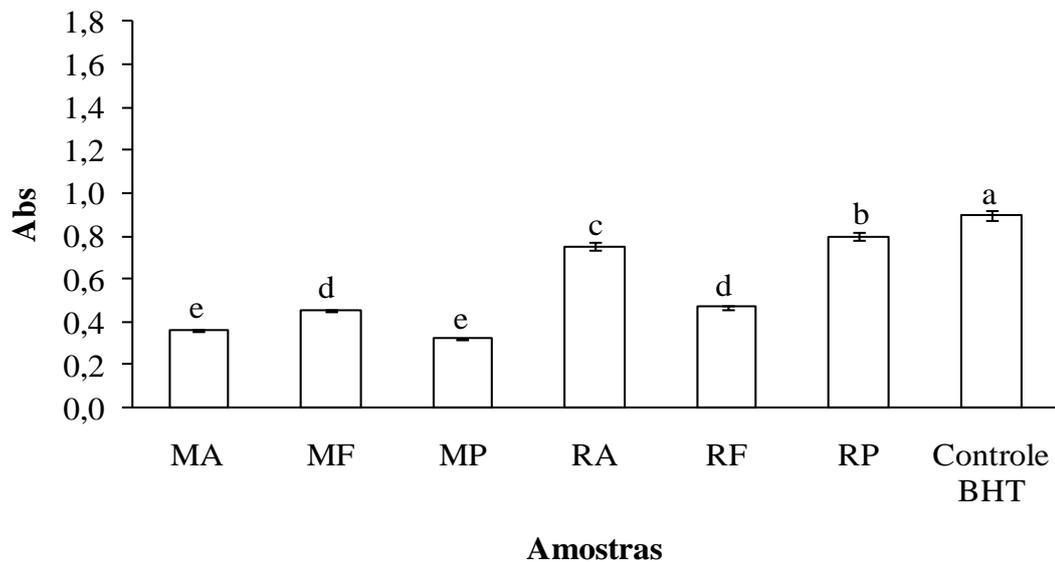
Figura 15 – Poder redutor dos hidrolisados de músculo e resíduo de bijupirá com Alcalase, Flavourzyme e Protamex integrais.



MA – hidrolisado do músculo com Alcalase; MF – hidrolisado do músculo com Flavourzyme; MP – hidrolisado do músculo com Protamex; RA – hidrolisado do resíduo com Alcalase; RF – hidrolisado do resíduo com Flavourzyme; e RP – hidrolisado do resíduo com Protamex.

Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as amostras através do teste de Tukey ($p < 0,05$; $n=3$).

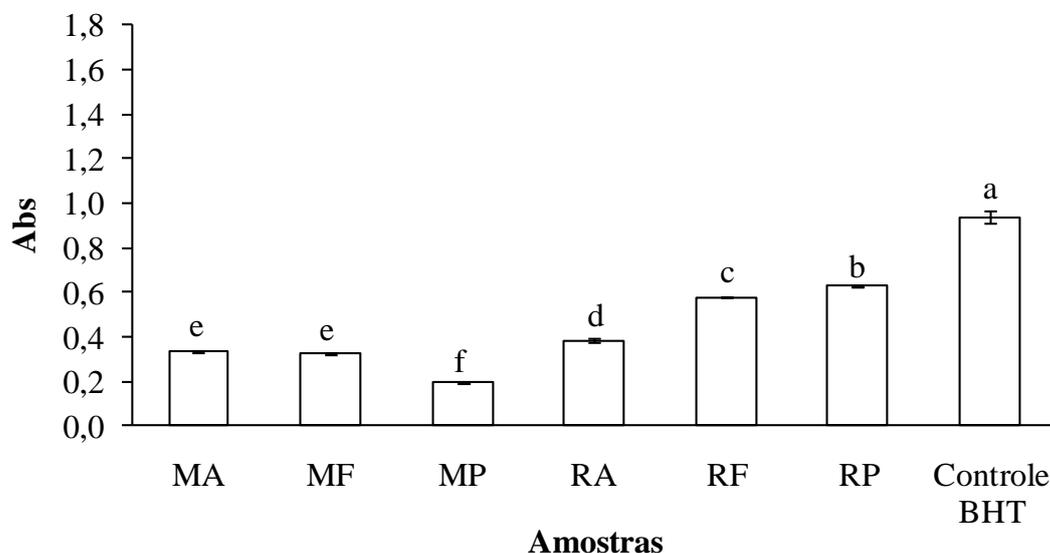
Figura 16 – Poder redutor dos hidrolisados de músculo e resíduo de bijupirá com Alcalase, Flavourzyme e Protamex nas frações peptídicas maiores que 3 kDa.



MA – hidrolisado do músculo com Alcalase; MF – hidrolisado do músculo com Flavourzyme; MP – hidrolisado do músculo com Protamex; RA – hidrolisado do resíduo com Alcalase; RF – hidrolisado do resíduo com Flavourzyme; e RP – hidrolisado do resíduo com Protamex.

Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as amostras através do teste de Tukey ($p < 0,05$; $n=3$).

Figura 17 – Poder redutor dos hidrolisados de músculo e resíduo de bijupirá com Alcalase, Flavourzyme e Protamex nas frações peptídicas menores que 3 kDa.



MA – hidrolisado do músculo com Alcalase; MF – hidrolisado do músculo com Flavourzyme; MP – hidrolisado do músculo com Protamex; RA – hidrolisado do resíduo com Alcalase; RF – hidrolisado do resíduo com Flavourzyme; e RP – hidrolisado do resíduo com Protamex.

Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as amostras através do teste de Tukey ($p < 0,05$; $n=3$).

Os hidrolisados mostraram diferente grau de doação de elétrons. Ao analisar os resultados para cada fração, verifica-se que o RP foi o que obteve maior poder redutor entre os integrais, diferindo das demais amostras ao nível de 5% de significância. Nas frações peptídicas maiores e menores que 3 kDa apenas o controle BHT obteve um valor maior que este hidrolisado. O hidrolisado que apresentou menor poder redutor foi o MP, seguido do MF constatando que não somente a enzima, mas também o substrato é de suma importância para fornecer cadeias peptídicas distintas e com diversas bioatividades. Ao compararmos o tipo de substrato, os resíduos foram os que tiveram maior potencial de doação de elétrons que o músculo em todas as frações.

Ao hidrolisar filés de pescada do Pacífico com 10 diferentes enzimas Cheung et al. (2012) obtiveram valores de poder redutor utilizando 3 mg/mL de amostra que variaram de 0,362 a 0,655 sendo as enzimas Protamex e Flavourzyme as que forneceram menores resultados, nesta ordem, assim como o músculo neste estudo.

Em geral, comparando o poder redutor dos hidrolisados e suas frações, percebe-se que as frações peptídicas maiores que 3 kDa foram as que forneceram maiores valores, exceto para os resíduos hidrolisados com Flavourzyme (menor que 3 kDa) e Protamex (integral). Este pode ser explicado porque o princípio desta habilidade não depende do tamanho da

cadeia peptídica e sim da presença de aminoácidos doadores de elétrons ou hidrogênio (JE et al., 2009). Por outro lado Moure, Domínguez e Parajó (2006) ao ultrafiltrarem a proteína de efluente de soja em diferentes frações (entre 5 e 10, 10 e 30, 30 e 50 e maior que 50 kDa) perceberam que a fração menor foi a que apresentou maior poder redutor, no entanto é uma fração de tamanho muito superior a deste trabalho abrangendo as frações estudadas.

Seguindo o mesmo princípio (tamanho das cadeias peptídicas), apesar de o resíduo ter fornecido maior poder redutor quanto maior o GH (RP, RA e RF, respectivamente), o músculo não se comportou desta forma. Existem trabalhos que correlacionam o poder redutor com o GH obtendo resultados contraditórios que tem relatado no que diz respeito à influência do tamanho molar na capacidade de reduzir o ferricianeto a ferricianato. Alguns estudos propõem que o maior GH, massas molares menores, resultam em aumento do poder redutor (BOUGATEF et al., 2010; DONG et al., 2008), enquanto outros demonstram que o poder redutor não depende do GH (BAMDAD; WU; CHEN, 2011; PIOTROWICZ, 2012) e ainda há estudos de proteínas de pescado com e sem hidrólise que demonstram maior potencial antes de hidrolisar o mesmo (CHEUNG et al., 2012).

As contradições encontradas na literatura sugerem que o tamanho pode não ser o mais importante contribuinte para o poder redutor. Uma relação positiva entre os aminoácidos acídicos e hidrofóbicos contendo enxofre, com a capacidade de redução de ferricianeto foi postulado por Udenigwe e Aluko (2011), podendo ser constatado neste trabalho, pois o RP foi o hidrolisado que obteve um teor de grupo sulfidril e um poder redutor muito superior aos demais.

Outra teoria é que o produto obtido, dependente da enzima e do substrato, por expor resíduos de aminoácidos com uma densa nuvem de elétrons nas cadeias laterais, como grupamentos polares ou carregados. Uma maior disponibilidade de aminoácidos livres durante a hidrólise pode fornecer uma fonte adicional de prótons e elétrons para manter um elevado potencial redox (BAMDAD; WU; CHEN, 2011; ZHU et al., 2008).

Dessa forma, dentre todos os hidrolisados avaliados quanto à sua capacidade em reduzir o ferricianeto a ferricianato na concentração de 5 mg/mL, os que apresentaram maior potencial foram o resíduo hidrolisado por Protamex integral e sua fração peptídica maior que 3 kDa com os respectivos valores de absorvância de 1,6131 0,7992, correspondendo 79,73 e -10,95% com relação ao controle BHT, demonstrando superioridade e similaridade podendo substituir este antioxidante comercial com o objetivo de aumentar o poder redutor.

5.6.3 Peroxidação lipídica do ácido linoleico

Ensaio realizados para medir o sequestro de radicais DPPH• e poder redutor do íon férrico têm sido amplamente utilizados para avaliar o potencial antioxidante de compostos fenólicos, flavonóides e, recentemente, misturas de peptídeos. No entanto, estes ensaios fornecem medidas de propriedade antioxidante através de um mecanismo diferente, o que pode não refletir os múltiplos mecanismos pelo qual as amostras podem atuar como antioxidantes para retardar ou inibir a oxidação lipídica em um sistema alimentar. Assim foi investigada a capacidade das amostras em suprimir a peroxidação lipídica no sistema modelo de ácido linoleico que está apresentada na Tabela 4 e a cinética da reação mostrada no Apêndice 10. As análises foram realizadas em momentos distintos, portanto são apresentados valores diferentes para os controles e o branco.

Tabela 4 – Diferença de peroxidação lipídica entre o último e primeiro dia e porcentagem de inibição com relação ao branco para músculo e resíduo de bijupirá hidrolisados por Alcalase, Flavourzyme e Protamex, integrais e nas frações peptídicas maiores e menores que 3 kDa.

Amostras	Integral		> 3 kDa		< 3 kDa	
	Diferença	%*	Diferença	%*	Diferença	%*
MA	0,0723 ^{eA}	57,54	0,0431 ^{gB}	52,39	-0,0375 ^{gC}	74,58
MF	0,2102 ^{dA}	40,55	0,0602 ^{fB}	46,80	-0,0460 ^{gC}	74,41
MP	0,0340 ^{fB}	60,50	0,0614 ^{eA}	47,99	-0,0085 ^{fC}	71,32
RA	0,0142 ^{gB}	57,02	0,0785 ^{cA}	40,93	0,0068 ^{dC}	65,36
RF	-0,0113 ^{hB}	46,64	0,1536 ^{gA}	56,12	0,0014 ^{eC}	69,26
RP	-0,0899 ^{iC}	52,79	0,0390 ^{gA}	53,19	-0,0032 ^{eB}	71,16
Branco	0,4893 ^a	0,00	0,1727 ^a	0,00	0,1727 ^a	0,00
Controle E	0,2957 ^c	31,10	0,1329 ^b	1,59	0,1329 ^b	1,59
Controle C	0,3370 ^b	45,02	0,0763 ^d	69,52	0,0763 ^c	69,52

Onde MA – hidrolisado do músculo com Alcalase; MF – hidrolisado do músculo com Flavourzyme; MP – hidrolisado do músculo com Protamex; RA – hidrolisado do resíduo com Alcalase; RF – hidrolisado do resíduo com Flavourzyme; RP – hidrolisado do resíduo com Protamex; Controle E – α -tocoferol; Controle C – ácido ascórbico; Branco – ausência de potencial antioxidante.

* Porcentagem da inibição da peroxidação lipídica com relação ao branco.

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna e maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre as amostras através do teste de Tukey ($p < 0,05$; $n = 3$).

Obs.: Números negativos foram considerados como inibição máxima.

No Apêndice 10 pode se observar que todas as amostras de hidrolisados demonstraram alguma capacidade para atrasar a peroxidação do ácido linoleico, assim como os controles (α -tocoferol e ácido ascórbico), embora o controle α -tocoferol tenha exibido uma proteção fraca, em comparação com o branco (sem a adição de antioxidante potencial).

As amostras nas primeiras 24 h apresentaram absorvâncias entre 0,0057 e 0,6220, valores considerados muito distantes um do outro, portanto, os gráficos apenas mostram o comportamento durante o período analisado, sendo mais indicado para compará-las que se utilize da diferença entre o 6º e 1º dia (Tabela 4), que fornece o quanto foi a inibição ao longo do tempo ou a porcentagem em relação ao branco (Tabela 4) que também é um indicativo do quanto foi possível inibir com a adição do composto no sistema.

No Apêndice 10 o comportamento de cada amostra é apresentado, sendo interessante salientar os brancos (ausência de potencial antioxidante) que apresentaram uma absorvância acima dos hidrolisados praticamente durante todo o período de análise; o ácido ascórbico que inibiu fortemente a peroxidação durante as primeiras 48 h, sendo muitíssimo eficaz para controlar este inconveniente por um tempo limitado e em condições controladas, pois o mesmo tem grande instabilidade físico-química, quando em condições aeróbicas, em exposição à luz, altas temperaturas, oxidando-se facilmente em soluções aquosas (GALLARATE et al., 1999); o α -tocoferol não apresentou uma capacidade de inibir intensamente a oxidação do ácido linoleico, percebendo-se que os hidrolisados demonstraram maior potencial quando comparados aos controles antioxidantes.

Dentre os hidrolisados de cada fração o que alcançou uma maior capacidade de inibir a oxidação do ácido linoleico foi o RP para os integrais e fração peptídica maior que 3 kDa, enquanto para as menores de 3 kDa foi o MF, analisando o quanto foi capaz de manter a absorvância ao longo do tempo. É possível constatar ainda que para os hidrolisados integrais e as frações peptídicas maiores que 3 kDa tiveram a maior inibição de peroxidação lipídica quando utilizado os resíduos hidrolisados, ao contrário, para as frações peptídicas menores que 3 kDa, foram os hidrolisados de músculo. Os hidrolisados que demonstram menores habilidades em retardar a peroxidação foram os MF integral, e o MF, MP e RA maiores que 3 kDa e em geral, os que apresentaram melhores resultados foram as frações peptídicas menores que 3 kDa seguidos dos hidrolisados integrais.

Alguns trabalhos sugerem que o GH pode influenciar nas respostas de análises para identificar a propriedade antioxidante (CENTENARO; MELLADO; PRENTICE, 2011), porém este não foi categórico para o sistema modelo ácido linoleico do presente estudo, visto que, apesar do RP ter fornecido um melhor resultado e possuir maior GH, para os outros

hidrolisados não foi seguido. Piotrovicz (2012) verificou que ao estudar a capacidade de inibição da peroxidação do ácido linoleico de hidrolisados de carne mecanicamente separada de anchoíta com diferentes enzimas (Alcalase, Flavourzyme e Protamex) em dois tempos de hidrólise (1 e 5 h) que este não havia relação, pois somente a Protamex forneceu um produto em que o maior tempo (maior GH) coincidentemente obteve maior capacidade antioxidante através deste método.

Cheung et al. (2012) avaliaram filés de pescada do Pacífico hidrolisadas com dez diferentes enzimas e o mesmo sem hidrólise e encontraram que as proteínas sem hidrolisar obtiveram valores de absorvância superiores ao branco quando que por outro lado, estas proteínas hidrolisadas forneceram valores muito inferiores ao branco e semelhantes ao antioxidante BHT. Bougatef et al. (2010) encontraram valores para seus hidrolisados de subprodutos de sardinha com diferentes enzimas inferiores ao branco e superiores ao α -tocoferol sem relação do GH com a capacidade de inibir a peroxidação do ácido linoleico.

Outro fator é a quantidade do potencial composto antioxidante utilizado, pois comparando com o trabalho de Zhuang et al. (2010) alguns, como os peptídeos, são dose-dependentes para este parâmetro, quando foram estudadas concentrações que variaram de 0,5 a 4,0 mg/mL de hidrolisado de gelatina de medusas do mar, que quanto maiores, maior o potencial de inibição de peroxidação, inclusive para o controle α -tocoferol, sendo que apenas para o controle BHT não houve esta influência.

Zavareze et al. (2014) avaliaram a influência do encapsulamento por lipossomas na capacidade de hidrolisados por Flavourzyme de músculo e do resíduo da filetagem de corvina para inibir peroxidação lipídica do ácido linoleico. E alcançaram 8, 27, 32, 22, 22, 26 e 43% de inibição (comparados ao branco) para as respectivas amostras: cápsula controle, hidrolisado do músculo (GH = 28,5%), hidrolisado do resíduo (GH = 27,0%), hidrolisado do músculo encapsulado, hidrolisado do resíduo encapsulado, α -tocoferol e ácido ascórbico. Estes resultados demonstraram que o encapsulamento reduziu a atividade antioxidante dos hidrolisados, sendo significativo apenas no hidrolisado de resíduo. Todos foram menores que as porcentagens encontradas para o sexto dia no presente trabalho que variou entre 41 e 61% para os hidrolisados integrais, 41 a 56 para as frações maiores que 3 kDa, 65 a 75% para as frações menores que 3 kDa e de 1,6 a 70% para os controles α -tocoferol e ácido ascórbico. Porém, Centenaro, Mellado e Prentice (2011) encontraram valores semelhantes ao deste trabalho ao avaliarem a inibição da oxidação do ácido linoleico pelas proteínas de ossos de castanha e frango hidrolisadas por diferentes proteases (Flavourzyme, α -Quimotripsina e

Tripsina) após 7 dias alcançando uma inibição de 77% para os ossos de corvina e 62% para os ossos de frango, ambos hidrolisados com Flavourzyme.

Concordando com Nazeer et al. (2011) pode-se dizer que a atividade inibitória da oxidação do ácido linoleico apresentada pela ação dos hidrolisados e suas frações peptídicas deve ser referente à composição dos peptídeos, além da ordem em que os aminoácidos estão colocados na cadeia peptídica. Logo, ao final de 6 dias de acompanhamento, os resultados deste estudo sugerem que não houve relação da capacidade dos hidrolisados em inibir a oxidação do ácido linoleico com o tipo de substrato ou enzima e tampouco com o GH, contudo sugerem que os hidrolisados podem conter peptídeos antioxidantes, obtendo-se os melhores resultados, em geral, para os hidrolisados integrais e frações peptídicas menores que 3 kDa, sendo os mais promissores o músculo hidrolisados por Alcalase e Flavourzyme menores que 3 kDa com inibições consideradas de praticamente 100% neste período, pois apresentaram valores próximos a zero, considerando os possíveis erros, assim como chegando próximo a 75% com relação ao branco.

5.6.4 Ensaio com células animais

Os hepatócitos de *zebrafish* podem ser utilizados para determinar a toxicidade de um composto. Nas Figuras 18 e 19 estão a densidade ótica do ensaio do MTT imediatamente (0), 24, 48 e 72 h após exposição a diferentes concentrações de hidrolisado com Protamex fracionado menor que 3 kDa. Todos foram diluídos em água e o controle é a ausência de hidrolisado no meio. Todos os experimentos estão expressos como valores médios (média \pm desvio padrão, n = 6).

Figura 18 – Efeito do hidrolisado proteico de músculo de bijupirá com Protamex menor que 3 kDa na viabilidade celular através do teste do MTT em dois momentos distintos (a e b).

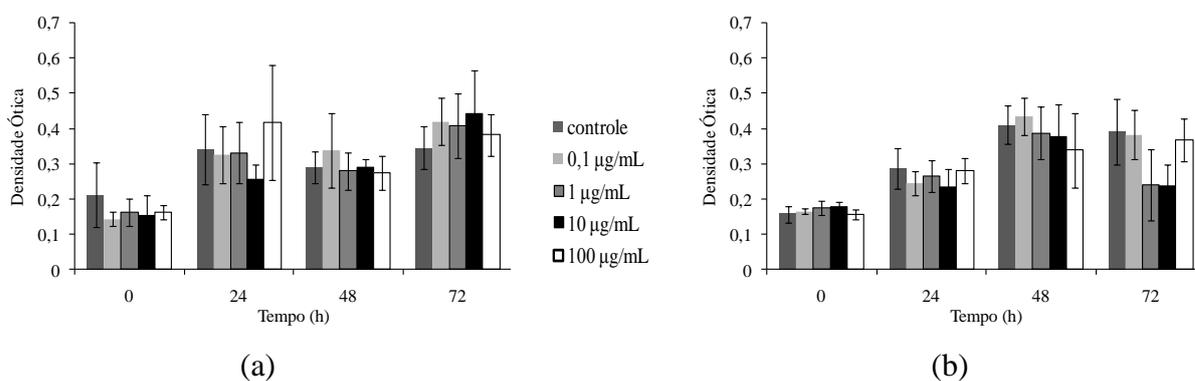
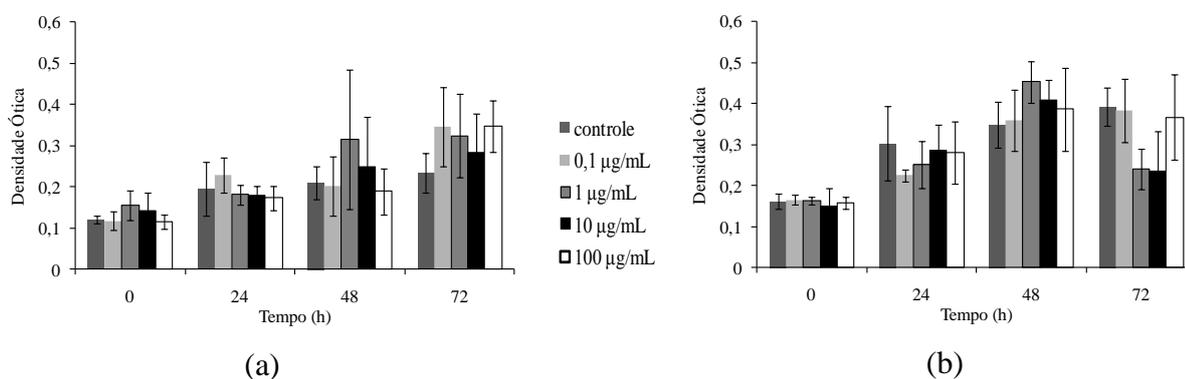


Figura 19 – Efeito do hidrolisado proteico de resíduo de bijupirá com Protamex menor que 3 kDa na viabilidade celular através do teste do MTT em dois momentos distintos (a e b).



As células quando são expostas a substâncias biologicamente prejudiciais podem sofrer alterações na morfologia, taxa de crescimento celular, morte celular e desintegração celular. Dessa forma, o monitoramento da viabilidade celular deve ser obrigatoriamente realizado para cada composto (MIRET; GROENE; KLAFFKE, 2006). O MTT pode detectar alterações na atividade mitocondrial, Mosmann (1983) mostra que apenas células vivas reagem ativamente ao MTT, enquanto que em células mortas a reação é praticamente nula, mesmo imediatamente após a lise celular. Estes resultados sugerem que a vida celular com mitocôndrias ativas é necessária e levantou a possibilidade de que a quantidade de cristais de formazan gerados pelas células depende do nível de energia do metabolismo da célula. Os ensaios de MTT foram realizados em dois momentos distintos (a e b), ou seja, em experimentos independentes para poder garantir a possível ausência de toxicidade do composto. Foi selecionada a fração menor que 3 kDa por haver maior probabilidade de migração para o interior da célula devido ao menor tamanho, pois já foi evidenciado que compostos de menor massa molar em células possuem a capacidade de prevenir e aliviar o estresse oxidativo (BEDNARSKA et al., 2008); os hidrolisados pela enzima Protamex por apresentar melhores resultados na maioria dos estudos podendo ser mais promissora como um composto bioativo e o músculo e resíduo para descartar a presença de alguma substância que demonstrasse citotoxicidade em algum dos substratos.

Foi realizado o teste de Tukey ao nível de 95% de confiança, comparando as diferentes concentrações e o controle em cada tempo, onde foi possível observar que todas as médias foram iguais estatisticamente, não demonstrando toxicidade dos compostos às células hepatócitas de *zebrafish* nas condições estudadas (tempo e concentração).

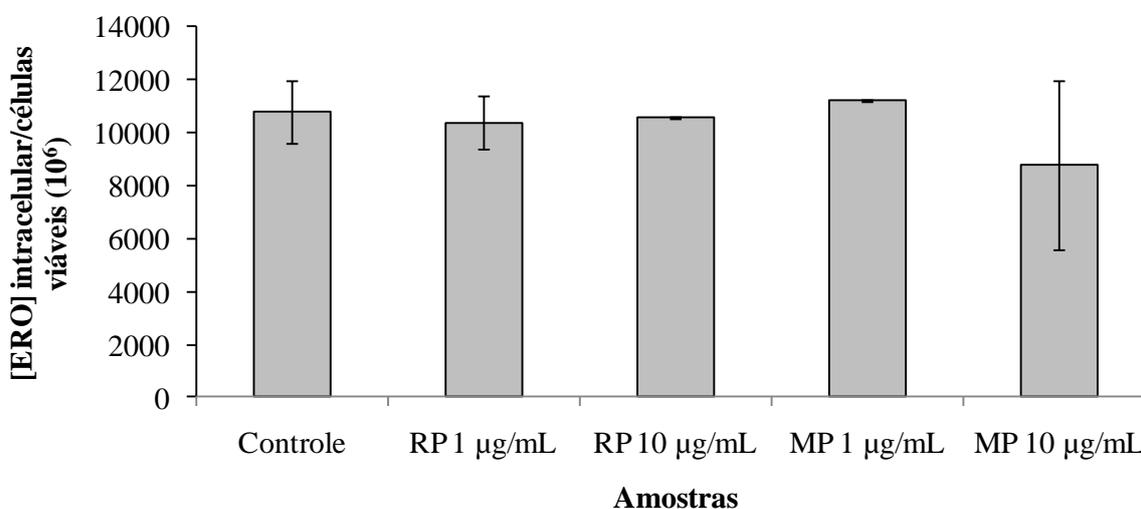
O ensaio de citotoxicidade define o potencial de degeneração ou morte celular

provocado pelo composto estudado. Assim, resultados positivos no ensaio de citotoxicidade descaracterizam a condição de inocuidade do composto, sendo possível causar processos de intoxicação nos usuários (DEMARCO et al., 1998).

Silva (2014) estudou a ausência de citotoxicidade em hepatócitos de *zebrafish* expostos às concentrações de 10 a 10000 $\mu\text{g/mL}$ de hidrolisados de ossos desmineralizados de corvina por Protamex na fração maior que 3 kDa e verificou que estes peptídeos não apresentam efeito tóxico para estas células.

A partir destes resultados foram selecionadas duas concentrações dos compostos (1 e 10 $\mu\text{g/mL}$), as intermediárias testadas, para avaliar o potencial em inibir a formação de ERO nas células de hepatócitos de *zebrafish*. Na Figura 20 estão expostos os resultados (média \pm desvio padrão, $n = 6$) da concentração de ERO por células viáveis, frente a um controle (ausência do potencial antioxidante).

Figura 20 – Efeito do hidrolisado proteico do músculo e resíduo do bijupirá com Protamex menores que 3 kDa em duas concentrações (1 e 10 $\mu\text{g/mL}$) nas espécies reativas ao oxigênio intracelular/viabilidade em células de hepatócitos de *zebrafish*.



RP – hidrolisado do resíduo com Protamex; MP – hidrolisado do músculo com Protamex.

Ao observarmos a Figura 20 pode-se perceber que não houve influência destes hidrolisados na inibição de formação de ERO, portanto, não podem ser considerados antioxidantes *in vivo* para estas células nas concentrações estudadas.

Alguns trabalhos evidenciam que alguns peptídeos podem reduzir a formação de ERO. Silva (2014) avaliou o efeito do hidrolisado de ossos desmineralizados de corvina com Protamex na fração maior que 3 kDa e o mesmo diminuiu as ERO no interior das células de

hepatócitos de *zebrafish* nas concentrações de 10, 100, 1000 e 10000 µg/mL, porém nas concentrações de 1000 e 10000 µg/mL não apresentaram atividade. Percebe-se que as concentrações maiores de hidrolisado utilizado ocasionaram um resultado negativo.

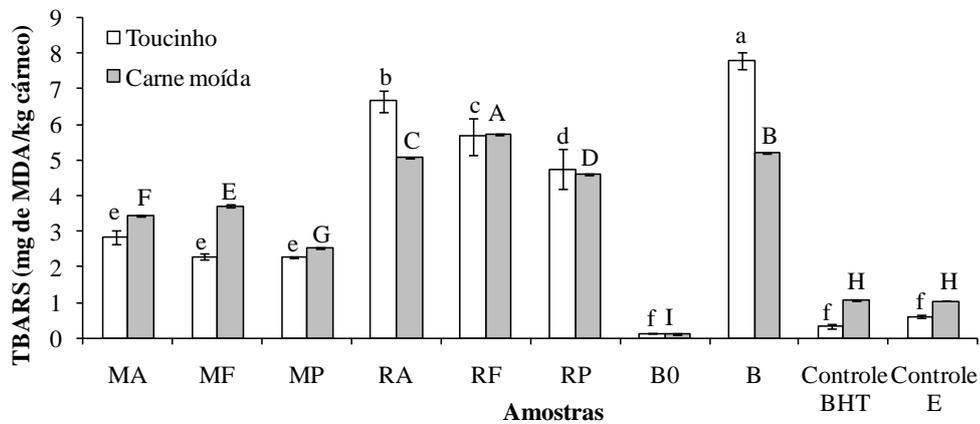
Os peptídeos apresentam um diferencial quando comparados à outras substâncias devido à sua capacidade de atravessar a membrana celular, alguns são administrados acoplados à drogas em medicamentos, são os chamados peptídeos célula-penetrantes (OKUYAMA et al., 2007). No entanto, a via de permeação da membrana pode variar para diferentes peptídeos de acordo com a sequência de aminoácidos, a composição da membrana lipídica, e a concentração de peptídeo (ZASLOFF, 2002), logo, a falta de capacidade em reduzir a formação de ERO no interior da célula pode ter ocorrido devido ao tipo de sequência de peptídeos obtidas pelas hidrólises.

Portanto, as frações peptídicas menores de 3 kDa dos hidrolisados de resíduo e músculo do bijupirá não demonstraram ser citotóxicas nas concentrações estudadas, porém não foram capazes de reduzir a formação de ERO. Seriam necessários estudos com outras concentrações e frações peptídicas, assim como avaliar quanto ao efeito de proteção frente a um agente pró-oxidante.

5.7 Aplicação dos hidrolisados e frações peptídicas em alimentos

A medida das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), apesar de suas limitações, é uma forma prática e rápida de calcular a rancidez, ou oxidação de lipídios em carnes ou produtos cárneos. Devido a estas características foi avaliada a formação de TBARS em toucinho e carne bovina moída ($24,35 \pm 2,65\%$ de lipídeos em base seca) adicionados de antioxidantes comerciais (BHT e α -tocoferol) e dos hidrolisados inteiros e suas frações peptídicas maiores e menores que 3 kDa, todos na concentração de 10 mg/mL, frente a um branco (sem antioxidante potencial) no início e após o tempo de reação (B0 e B, respectivamente) a fim de avaliar o potencial destes diante de um alimento simulado, representado nas Figuras 21, 22 e 23.

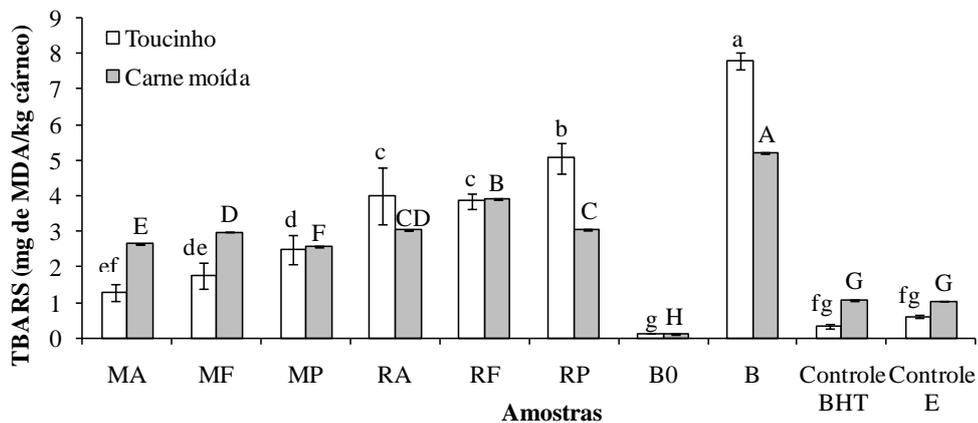
Figura 21 – Efeito dos hidrolisados de músculo e resíduo de bijupirá com Alcalase, Flavourzyme e Protamex integrais na formação de TBARS em alimentos.



MA – hidrolisado do músculo com Alcalase; MF – hidrolisado do músculo com Flavourzyme; MP – hidrolisado do músculo com Protamex; RA – hidrolisado do resíduo com Alcalase; RF – hidrolisado do resíduo com Flavourzyme; RP – hidrolisado do resíduo com Protamex; Controle BHT - BHT; Controle E – α -tocoferol; B0 – ausência de potencial antioxidante no tempo zero; e B – ausência de potencial antioxidante.

Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre as amostras para o toucinho e letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre as amostras para a carne moída através do teste de Tukey ($p < 0,05$; $n=3$).

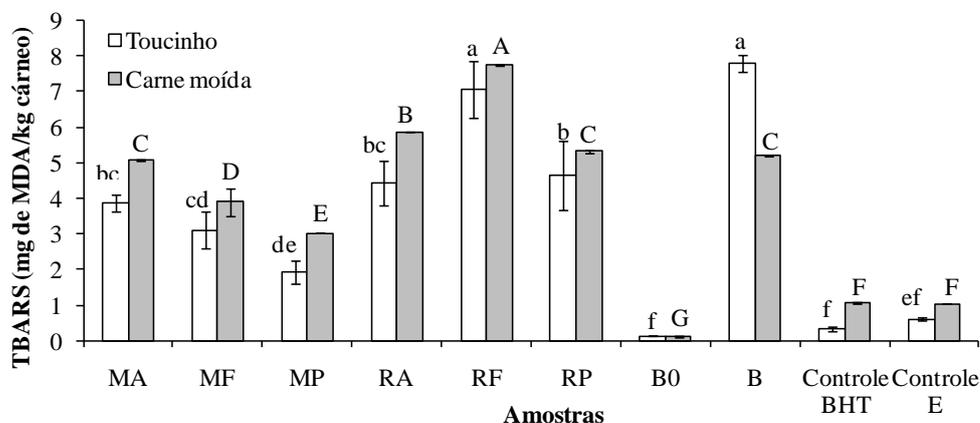
Figura 22 – Efeito dos hidrolisados de músculo e resíduo de bijupirá com Alcalase, Flavourzyme e Protamex nas frações peptídicas maiores que 3 kDa na formação de TBARS em alimentos.



MA – hidrolisado do músculo com Alcalase; MF – hidrolisado do músculo com Flavourzyme; MP – hidrolisado do músculo com Protamex; RA – hidrolisado do resíduo com Alcalase; RF – hidrolisado do resíduo com Flavourzyme; RP – hidrolisado do resíduo com Protamex; Controle BHT - BHT; Controle E – α -tocoferol; B0 – ausência de potencial antioxidante no tempo zero; e B – ausência de potencial antioxidante.

Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre as amostras para o toucinho e letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre as amostras para a carne moída através do teste de Tukey ($p < 0,05$; $n=3$).

Figura 23 – Efeito dos hidrolisados de músculo e resíduo de bijupirá com Alcalase, Flavourzyme e Protamex nas frações peptídicas menores que 3 kDa na formação de TBARS em alimentos.



MA – hidrolisado do músculo com Alcalase; MF – hidrolisado do músculo com Flavourzyme; MP – hidrolisado do músculo com Protamex; RA – hidrolisado do resíduo com Alcalase; RF – hidrolisado do resíduo com Flavourzyme; RP – hidrolisado do resíduo com Protamex; Controle BHT - BHT; Controle E – α -tocoferol; B0 – ausência de potencial antioxidante no tempo zero; e B – ausência de potencial antioxidante.

Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre as amostras para o toucinho e letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre as amostras para a carne moída através do teste de Tukey ($p < 0,05$; $n=3$).

Um produto cárneo homogeneizado pode ser um meio eficaz para investigar os efeitos protetores de substâncias antioxidantes que sejam solúveis em água contra a peroxidação lipídica em uma matriz alimentícia (LEE; HENDRICKS, 1997). Na legislação brasileira não há indicativo do valor máximo de TBARS permitido para diversos alimentos (OSAWA; FELÍCIO; GONÇALVES, 2005), no entanto, altos valores de TBARS comprometem a comercialização e aceitação do produto final (OLIVEIRA-FILHO et al., 2010). Valores de TBARS acima de 1,59 mg de MDA/kg de amostra podem causar danos à saúde do consumidor (TORRES; OKANI, 1997). Os aromas de ranço em carnes são inicialmente detectados sensorialmente em valores de 0,5 a 2,0 mg de MDA/kg de carne (O'NEILL et al., 1998).

Nas Figuras 21, 22 e 23 mostram-se os teores de TBARS presentes em toucinho e carne bovina moída. Para ambos os produtos pode-se verificar que no início praticamente não existia MDA, pois a amostra B0 apresentou um valor muito inferior aos demais (0,13 e 0,11 mg/kg, para o toucinho e carne moída bovina).

Uma característica importante é o tipo de substrato que dá origem aos peptídeos presentes em cada hidrolisado, pois tanto para o toucinho, quanto para a carne bovina moída o

que obteve menor MDA foi o músculo mesmo após o fracionamento, observando-se que para a mesma enzima o resíduo apresentou sempre um teor superior desta substância.

Analisando o efeito dos hidrolisados integrais nos produtos é possível verificar que existe alguma relação entre o GH e o teor de MDA, já que seguiram um comportamento semelhante, onde os maiores resultados de GH forneceram maior proteção aos lipídeos contra oxidação, enquanto os de menor GH obtiveram maior TBARS. Com relação ao tamanho, em geral, as frações peptídicas maiores que 3 kDa resultaram em menor TBARS, após os inteiros e, por último, as frações peptídicas menores que 3 kDa.

O branco (ausência de potencial antioxidante), comparado aos hidrolisados e controles, obteve MDA superior com diferença estatística a 5% de significância demonstrando que praticamente todos os hidrolisados puderam atuar na redução da oxidação lipídica, exceto na carne bovina moída com o hidrolisado RF integral e menor que 3 kDa, onde se pode constatar que houve uma indução de oxidação. Em toucinho o branco obteve valores maiores de TBARS, talvez devido ao seu maior teor de lipídeos em média 83 g/100g (totais), 53 mg/100g (colesterol) com valores significativos em todos os ácidos graxos com exceção do 15:1 ω 9, e considerados maiores quando comparado com outros cortes como o lombo, pernil e paleta suína em um trabalho de Bragagnolo e Rodriguez-Amaya (2002).

Os valores de TBARS (mg de MDA/kg de carne) variaram de 0,13 (B0) à 7,79 (B) no toucinho e 0,11 (B0) à 7,75 (RF menor que 3 kDa) na carne bovina moída. Os controles foram os antioxidantes com maior eficácia, sendo capazes de inibir fortemente a peroxidação, sobressaindo aos hidrolisados. Apenas o MA maior que 3 kDa e o MP menor que 3 kDa foram semelhantes a algum antioxidante comercial em toucinho, sendo os que apresentaram valores menores (1,28 e 1,92 mg/kg), correspondendo a uma inibição de 83,57 e 75,35%. Na carne bovina moída o MP foi o que obteve maior potencial de inibição da formação de TBARS em qualquer fração, hidrolisados inteiros, frações peptídicas maiores e menores que 3 kDa (2,54, 2,56 e 3,02) com 51,15, 50,77 e 41,92% de inibição.

Outros trabalhos realizados no laboratório demonstraram que os peptídeos possuem a habilidade de reduzir ou retardar o desenvolvimento de TBARS. Piotrowicz (2012) encontrou 3,22 mg MDA/kg de CMS de anchoíta utilizando 10 mg de hidrolisado de CMS de anchoíta com Flavourzyme com 5 h de hidrólise maior que o hidrolisado por 1 h e correspondendo a uma inibição de 12,5% com relação ao branco com 3,68 mg de MDA/kg de carne, sendo menor do que o encontrado neste trabalho.

Centenaro (2011) avaliou diferentes concentrações (2,5 a 40 mg/mL) de hidrolisado de pescado com Flavourzyme e de frango com Quimotripsina alcançando os respectivos 72 e

73,8% na concentração de 20 mg/mL, e quando se adicionaram 40 mg/mL 93 e 80% da oxidação lipídica foi inibida. Oliveira et al. (2014) aplicaram proteína isolada de soja hidrolisada por 6 h com protease bacteriana em 2 tipos de produto nas concentrações de 2 e 10 mg/mL obtendo os respectivos 46,70 e 62,64% para carne suína e 11,74 e 65,09% para o salmão, ainda considerados inferiores aos melhores resultados deste estudo.

Quanto a peptídeos de derivados lácteos, em uma pesquisa utilizando diferentes concentrações de hidrolisados de caseína com Flavourzyme (2,5 a 40 mg/mL) em carne moída foi obtida a inibição de formação de TBARS em 23 e 94%, e em CMS de aves foi de 10 e 14% para 2,5 e 10 mg/mL e quando usado a partir de 20 mg/mL em carne moída foi obtido 100% de inibição (ROSSINI et al., 2009). Por outro lado, Sakanaka et al. (2005) obtiveram 69,7% de inibição da oxidação em carne moída com peptídeos de caseinato de cálcio hidrolisado por 20 h com Oryzina empregando 20 mg/mL, considerando a concentração utilizada este potencial antioxidante representa ser menos efetivo que os do presente trabalho e outros citados, visto que concentrações menores de outros hidrolisados apresentaram porcentagem maior desta capacidade.

No estudo de diferentes frações de proteína de leite hidrolisada com diferentes enzimas microbianas incorporados em carne moída para determinar seu impacto sobre a peroxidação lipídica em 1, 8 e 15 dias, apenas a fração entre 1 e 3 kDa com a enzima Validase (200 µg/g de carne) a reduziu significativamente (35%) e o aumento da dosagem (800 µg/g), não aumentou a inibição sobre a oxidação lipídica da carne (HOGAN et al., 2009). Assim como no trabalho de Zhang, Li e Zhou (2010) que fracionaram proteína de soja hidrolisada com diferentes enzimas microbianas agregadas em carne moída para determinar a peroxidação lipídica por 15 dias, dentro de todos o que apresentou melhor resultado foi com 20,1% de redução, sendo este obtido com a adição do hidrolisado por uma protease alcalina de *Bacillus licheniformis* e ultrafiltrado entre 1 e 3 kDa e de 12,9% quando por uma protease neutral de *Bacillus subtilis* e uma fração maior que 3 kDa, ambas na concentração máxima estudada (800 µg/g). Com valores menores, contudo as concentrações são inferiores à empregada com os hidrolisados de bijupirá que, considerando a proporção antioxidante:amostra foi de 60 mg/g.

Finalmente, vários hidrolisados e suas frações obtidas neste trabalho podem ser potencialmente empregados como antioxidantes naturais alternativos em alimentos, dificultando e/ou retardando a oxidação lipídica que conduz ao ranço, o que melhora a qualidade e aumenta a vida útil de produtos alimentícios, destacando-se o hidrolisado do

músculo com Protamex (MP) menor que 3 kDa, que foi capaz de atuar positivamente tanto no toucinho quanto na carne moída.

6 CONCLUSÃO

Hidrolisados proteicos do músculo e do resíduo do bijupirá com três enzimas comerciais foram obtidos, onde a enzima Protamex foi a que apresentou maior grau de hidrólise, quando comparada com as enzimas Alcalase e Flavourzyme, demonstrando, portanto maior capacidade de atuação nas proteínas presentes neste pescado.

A cinética de hidrólise do músculo e resíduo do bijupirá pelas enzimas Alcalase, Flavourzyme e Protamex foi acompanhada e o seu comportamento determinado.

O teor de proteína solúvel determinada em tirosina variou de acordo com o substrato e a enzima, obtendo-se os maiores valores para o resíduo hidrolisado por Alcalase e por Protamex e para o músculo hidrolisado por Protamex.

A ultrafiltração dos hidrolisados em frações peptídicas maiores e menores de 3 kDa forneceu novos produtos com atividades e intensidades antioxidantes distintas dos hidrolisados integrais. A eficiência da membrana e o número de reusos não puderam ser avaliados através da microscopia eletrônica de varredura, não sendo este um parâmetro alternativo à análise de distribuição de massa molar por cromatografia.

O teor de grupos sulfidril foi superior nos hidrolisados de resíduo que nos de músculo, o fracionamento permitiu verificar que a maior parte do aminoácido cisteína está presente na fração peptídica maior que 3 kDa. Dentre as enzimas, sobressaiu-se a Protamex sobre as proteínas do resíduo e a Flavourzyme sobre as do músculo.

Dentre todos os hidrolisados o proveniente de músculo com Protamex se apresentou mais efetivo no sequestro do radical DPPH (50 mg/mL) alcançando 81,35%, seguido pelo de músculo com Flavourzyme – 60,77% e resíduo com Flavourzyme – 60,25%. Quanto à capacidade redutora todos demonstraram algum potencial, sendo os hidrolisados de resíduo os que obtiveram maiores valores de absorvância, destacando-se o obtido pela enzima Protamex. Todos hidrolisados foram capazes de inibir a peroxidação lipídica do ácido linoleico apresentando-se semelhantes aos controles α -tocoferol e ácido ascórbico, sendo o músculo hidrolisado por Protamex o que alcançou o maior valor.

Os hidrolisados nas frações peptídicas maiores que 3 kDa, tanto de músculo quanto de resíduo, não foram capazes de sequestrar o radical DPPH (50 mg/mL), enquanto entre os menores que 3 kDa, os resíduos se mostraram mais eficientes que o músculo, porém em geral suas capacidades foram reduzidas ou permaneceram semelhantes aos integrais, não sendo interessante o fracionamento neste mecanismo.

No que se refere ao poder redutor, os hidrolisados de resíduo mostraram-se superiores aos de músculo em qualquer fração peptídica, porém a ultrafiltração não melhorou a eficiência. Comparando as frações, a maior que 3 kDa foi mais redutora que a menor que 3 kDa para a maioria dos hidrolisados com evidência para o hidrolisado de resíduo com a enzima Protamex.

A peroxidação lipídica foi inibida por todas as frações, dando ênfase aos peptídeos menores que 3 kDa através dos parâmetros de capacidade de manter a absorvância aproximadamente constante e da porcentagem de inibição relacionado ao branco.

Os hidrolisados avaliados não demonstraram ser citotóxicos às células de hepatócitos de *zebrafish*, porém também não apresentaram capacidade de inibir a formação de espécies reativas de oxigênio.

A aplicação dos hidrolisados e suas frações peptídicas em matrizes alimentícias (toucinho e carne bovina moída) demonstrou que muitos apresentaram habilidade para inibir a formação de TBARS, apesar de terem sido menos efetivos que os antioxidantes comerciais, as frações peptídicas maiores que 3 kDa dos hidrolisados de músculo reduziram em torno da metade o teor de TBARS formado na carne moída e de mais de 80% no toucinho.

Em geral, os hidrolisados e suas frações peptídicas obtidas apresentaram capacidades antioxidantes diferentes em cada mecanismo e demonstraram ser promissores como antioxidantes inócuos à saúde em alimentos. Destacando que a ultrafiltração não seria um processo necessário e que a enzima Protamex forneceu hidrolisados proteicos de músculo e resíduo de bijupirá com altas atividades antioxidantes.

7 PERSPECTIVAS

Determinar a sequência de aminoácidos de cada hidrolisado e cada fração peptídica a fim de identificar os peptídeos responsáveis pela atividade antioxidante e explicar o mecanismo do mesmo;

Avaliar as espécies reativas de oxigênio nos hepatócitos de *zebrafish* com a presença de agentes oxidantes;

Estudar os peptídeos como antioxidantes em diferentes alimentos, em várias concentrações durante distintos períodos de armazenamento;

Verificar a eficiência das membranas na separação das frações peptídicas;

Definir a reutilização das membranas, quanto à sua eficiência de separação.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER-NISSEN, J. 1986. **Enzymatic hydrolysis of food proteins**. London: Elsevier Applied Science Publishing, 1986.

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.

ALLINGER, N. L. **Química Orgânica**. Segunda edição, Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 1976.

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Methods for determination of in vitro antioxidant activity for extracts and organic compounds. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.

AMANUMA, K.; TAKEDA, H.; AMANUMA, H.; AOKI, Y. Transgenic zebrafish for detecting mutations caused by compounds in aquatic environments. **Nature Biotechnology**, v. 18, p. 62–65, 2000.

AMIZA, M. A.; KONG, Y. L.; FAAZAZ, A. L. Effects of degree of hydrolysis on physicochemical properties of cobia (*Rachycentron canadum*) frame hydrolysate. **International Food Research Journal**, v. 19, n. 1, p. 199-206, 2012.

ANJO, D. F. C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **Jornal Vascular Brasileiro**, p. 3, n. 2, p.145-54, 2004.

ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P. D.; PATSALIDES, E.; MCDONALD, S.; ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. **Analyst**, v. 127, p. 183–198, 2002.

AOAC- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**, 17th edition, Washington, D. C., CD-ROM, 2000.

ARAI, S. Studies on functional foods in Japan – State of the art. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 60, n. 1, p. 9-15, 1996.

ARAÚJO, J. **Química de alimentos: teoria e prática**. 2^a ed. Viçosa: Editora UFV, 416p., 1999.

ARAYA, H.; LUTZ, M. R. Alimentos funcionales y saludables. **Revista Chilena de Nutrición**, v. 30, n. 1, p. 8-14, 2003.

ATMACA, G. Antioxidant effects of sulfur-containing amino acids. **Yonsei Medical Journal**, v. 45, p. 776–788, 2004.

BAILEY, A. J.; LIGHT, N. D. **Meat and meat products**. Bristol: Elsevier Applied science, 355p., 1989.

BAMDAD, F.; WU, J.; CHEN, L. Effects of enzymatic hydrolysis on molecular structure and antioxidant activity of barley hordein. **Journal of Cereal Science**, v. 54, n. 1, p. 20–28, 2011.

BARRY, H., Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry and role in human disease. **The American Journal of Medicine**, v. 91, p. 14S-22S 1991.

BEDNARSKA, S.; LEROY, P.; ZAGULSKI, M.; BARTOSZ, G. Efficacy of antioxidants in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* correlates with their effects on protein thiols. **Biochimie**, v. 90, p. 1476-1485, 2008.

BENETTI, D.; SARDENBERG, B.; HOENIG, R.; WELCH, A.; STIEGLITZ, J.; MIRALAO, S.; FARKAS, D.; BROWN, P.; JORY, D. Cobia (*Rachycentron canadum*) hatchery-to-market aquaculture technology: recent advances at the University of Miami Experimental Hatchery (UMEH). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 60-67, 2010.

BENETTI, D. D., ORHUN, M. R., O'HANLON, B., ZINK, I., CAVALIN, F. G., SARDENBERG, B., PALMER, K., DENLINGER, B., BACCOAT, D. **Aquaculture of Cobia (*Rachycentron canadum*) in the Americas and the Caribbean**. In: LIAO, I. C.; LEANO, E. M. (Eds.), Cobia Aquaculture: Research, Development, and Commercial Production. Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, World Aquaculture Society, Louisiana, USA, The Fisheries Society of Taiwan, Keelung, Taiwan, and National Taiwan Ocean University, Keelung, Taiwan, p. 57-77, 2007.

BENKAJUL, S.; SEYMOUR, T. A.; MORRISSEY, M. T.; AN, H. Physicochemical changes in pacific whiting muscle proteins during iced storage. **Journal of Food Science**, v. 62, n. 4, p. 729-733, 1997.

BERNARDINI, R.; HARNEDY, P.; BOLTON, D.; KERRY, J.; O'NEILL, E.; MULLEN, A. M.; HAYES, M. Antioxidant and antimicrobial peptidic hydrolysates from muscle protein sources and by-products. **Food Chemistry**, v. 124, p. 1296-1307, 2011.

BEVERIDGE, T.; JONES, L.; TUNG, M. A. Progel and gel formation and reversibility of gelation of whey, soybean, and albumen protein gels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 32, n. 2, p. 307-313, 1984.

BHASKAR, N.; MAHENDRAKAR, N. S. Protein hydrolysate from visceral waste proteins of Catla (*Catla catla*): Optimization of hydrolysis conditions for a commercial neutral protease. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4105-4111, 2008.

BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v. 181, p. 1199-1200, 1958.

BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. **Introdução a Química de Alimentos**. 3 ed., São Paulo: Livraria Varela, 238p., 2003.

BONDET, V.; BRAND-WILLIAMS, W.; BERSSET, C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH• free radical method. **Lebensmittel-Wissenschaft und –Technologie**, v. 30, p. 609-615, 1997.

BORSEAU, P.; VANDANJON, L.; JAOUEN, P.; CHAPLAIN-DEROUINIOT, M.; MASSÉ, A.; GUÉRARD, F.; CHABEAUD, A.; FOUCHEREAU-PÉRON, M.; LE GAL, Y.; RAVALLEC-PLÉ, R.; BERGÉ, J.-P.; PICOT, L.; PIOT, J.-M.; BATISTA, I.; THORKELSSON, G.; DELANNOY, C.; JAKOBSEN, G.; JOHANSSON, I. Fractionation of fish protein hydrolysates by ultrafiltration and nanofiltration: impact on peptidic populations. **Archive Institutionnelle de l'Ifremer**, v. 244, n. 1-3, p. 303-320, 2009.

BOSCOLO, W. R.; HAYASHI, C.; MEURER, F. Digestibilidade aparente da energia e proteína das farinhas de resíduo da filetagem da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e da corvina (*Plagioscion squamosissimus*) e farinha integral do camarão canela (*Macrobrachium amazonicum*) para a tilápia do Nilo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 1, p. 8-13, jan/fev, 2004.

BOUGATEF, A.; NEDJAR-ARROUME, N.; MANNI, L.; RAVALLEC, R.; BARKIA, A.; GUILLOCHON, D.; NASRI, M. Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products proteins. **Food Chemistry**, v. 118, p. 559–565, 2010.

BRAGAGNOLO, N.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Teores de colesterol, lipídios totais e ácidos graxos em cortes de carne suína. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 1, p. 98-1043, 2002.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebesm Wiss u Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) - Ministério da Saúde. Resolução n. 2, de 7 de janeiro de 2002. **Regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedade funcional ou de saúde**. Publicada no Diário Oficial da União, Brasília, 17 de julho 2002. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/02_02rdc.htm. Acesso em: 05/11/2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) - Ministério da Saúde. Resolução n. 18, de 30 de abril de 1999. **Regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos**. Republicada no Diário Oficial da União, Brasília, 03 de dezembro de 1999. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/18_99.htm. Acesso em: 08/11/2010.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura: Brasil 2010**. Brasília: MPA, 128p., 2010.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Consumo de pescado no Brasil aumenta 23,7% em dois anos**. 2013. Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/index.php/imprensa/noticias/2226-consumo-de-pescado-no-brasil-aumenta-237-em-dois-anos>. Acesso em: 23/08/2014.

BRITO, L. F. **Uso de farinha de sangue na nutrição de frangos de corte**. Disponível em <http://www.polinutri.com.br/upload/artigo/186.pdf> Acesso em: setembro/2010.

BRUCE, A; BRAY D, LEWIS, J; RAFF, M; ROBERTS K, WATSON, J. D. **Molecular biology of the cell**. 4 ed. New York: Garland Science. 2001, p. 1649.

BULKLEY, G. B. The role of oxygen free radicals in human disease processes. **Surgery**, v. 94, p. 407-411, 1983.

CARREIRA, R. L.; ORNELLAS, C. B. D.; MORAIS, H. A.; MOTTA, S.; SILVESTRE, M. P. C. Efeito da precipitação pelo ácido tricloroacético (TCA) e da ultrafiltração sobre o perfil peptídico de hidrolisado de caseína. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 2, p. 414-421, 2003.

- CENTENARO, G. S. **Obtenção de peptídeos com atividade antioxidante a partir de proteínas de origem animal**. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2011.
- CENTENARO, G. S.; PIOTROWICZ, I. B.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Estudo comparativo da atividade antioxidante em hidrolisados proteicos de pescado e de frango. In: XVII CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA – X ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO. Pelotas, 2008.
- CENTENARO, G. S.; SALAS-MELLADO, M.; PIRES, C.; BATISTA, I.; NUNES, M. L.; PRENTICE C. Fractionation of protein hydrolysates of fish and chicken using membrane ultrafiltration: investigation of antioxidant activity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 6, p. 2877-2893, 2014.
- CENTENARO, G. S.; SALAS-MELLADO, M.; PIRES, C.; BATISTA, I.; NUNES, M. L.; PRENTICE C. Antioxidant Activity of Protein Hydrolysates of Fish and Chicken Bones. **Advance Journal of Food Science and Technology**, v. 3, n. 4, p. 280-288, 2011.
- CHANG, D. O cultivo do bijupirá em Taiwan: a escolha de um peixe de carne branca para consumidores exigentes. **Panorama da Aquicultura**, v. 13, n. 79, p. 43-49, 2003.
- CHEN, H. M.; MURAMOTO, K.; YAMAUCHI, F.; FUJIMOTO, K.; NOKIHARA, K. Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 1, p. 49–53, 1998.
- CHEN, H. M.; MURAMOTO, K.; YAMAUCHI, F. Structural analysis of antioxidative peptides from soybean b-conglycinin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 574–578, 1995.
- CHERYAN, M. **Ultrafiltration and microfiltration handbook**, Technomic Publishing Co, Inc.: Lancaster, USA, 1998.
- CHEUNG I. W. Y.; CHEUNG, L. K. Y.; TAN, N. Y.; LI-CHAN, E. C. Y. The role of molecular size in antioxidant activity of peptide fractions from Pacific hake (*Merluccius productus*) hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 134, p. 1297–1306, 2012.
- CHOU, R. L.; SU, M. S.; CHEN, H. Y. Optimal dietary protein and lipid levels for juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). **Aquaculture**, v. 193, p. 81-89, 2001.
- CHOW, C. K. **Cellular Antioxidant Defense Mechanisms**, v. II, Boca Raton: CRC Press, 1988.
- CHUANG, J.-L.; LIN, R.-T.; SHIAU, C.-Y. Comparison of meat quality related chemical compositions of wild-captured and cage-cultured cobia. **Journal of Marine Science and Technology**, v. 18, n. 4, p. 580-586, 2010.
- CHUANG, J.-L.; LIN, R.-T.; SHIAU, C.-Y. The Relationship between chemical compositions and body weight of cultured cobia (*Rachycentron canadum*) of different growing stages. **Journal of the Fisheries Society of Taiwan**, v. 34, n. 1, p. 21-30, 2007.

- CIPAK, A.; JAGANJAC, M.; TEHLIVETS, O.; KOHLWEIN, S. D.; ZARKOVIC, N. Adaptation to oxidative stress induced by polyunsaturated fatty acids in yeast. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1781, p. 283–287, 2008.
- CLEMENTE, A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. **Trends Food Science Technology**, v. 11, n. 7, p. 254-262, 2000.
- CORRÊA, A. P. F.; DAROIT, D. J.; COELHO, J.; MEIRA, S. M. M.; LOPES, F. C.; SEGALIN, J.; RISSO, P. H.; BRANDELLI, A. Antioxidant, antihypertensive and antimicrobial properties of ovinemilk caseinate hydrolyzed with a microbial protease. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 12, p. 2247-54, 2011.
- COSTA, V.; MORADAS-FERREIRA, P. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 22, n. 4-5, p. 217-246, 2001.
- CRAIG, P. M.; WOOD, C. M.; MCCLELLAND, G. B. Oxidative stress response and gene expression with acute copper exposure in zebrafish (*Danio rerio*). **American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 293, p. 1882–1892, 2007.
- CRAIG, S. R., SCHWARZ, M. H., McLEAN, E., Juvenile coibia (*Rachycentron canadum*) can utilize a wide range of protein and lipid levels without impacts on production characteristics. **Aquaculture**, v. 261, p. 384-391, 2006.
- CUDENNEC, B.; RAVALLEC-PLÉ, R.; COUROIS, E.; FOUCHEREAU-PERON, M. Peptides from fish and crustacean by-products hydrolysates stimulate cholecystokinin release in STC-1 cells. **Food Chemistry**, v. 111, p. 970–975, 2008.
- DANI, C.; BONATTO, D.; SALVADOR, M.; PEREIRA, M. D.; HENRIQUES, J. A. P.; ELEUTHERIO, E. Antioxidant Protection of Resveratrol and Catechin in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 4268–4272, 2008.
- DATE, K.; YAMAMOTO, Y. Seasonal variations with growth in nutritive components in meat of cultured yellowtail *Seriola quinqueradiata*. **Nippon Suisan Gakkaishi**, v. 54, p. 1041-1047, 1988.
- DEMARCO, F. F.; TARQUINIO, S. B. C. C.; JAEGER, M. M. M.; MATSON, E. Evaluation of the cytotoxicity of two dentin-bonding systems. **Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo**, v. 12, n. 4, p. 375-82, 1998.
- DEPARTMENT OF AGRICULTURE – FISHERIES AND FORESTRY. Disponível em: <https://www.daff.qld.gov.au/fisheries/species-identification/inshore-estuarine-species/cobia>. Acesso em: 15/08/2014.
- DENEKE, S. M.; FANBURG, B. L. Regulation of cellular glutathione. **American Journal of Physiology**, v. 257, p. L163-173, 1989.
- DIKALOVA, A. E.; KADIISKA, M. B.; MASON, R. P. An *in vivo* ESR spin-trapping study: Free radical generation in rats from formate intoxication-role of the Fenton reaction. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 24, p. 13549–13553, 2001.

- DINIZ, F. M.; MARTIN, A. M. Fish protein hydrolysates by enzymatic processing. **Agro-Food Industry Hi-Tech**, v. 4, p. 9-13, 1997.
- DONG, S.; ZENG, M.; WANG, D.; LIU, Z.; ZHAO, Y.; YANG, H. Antioxidant and biochemical properties of protein hydrolysates prepared from Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). **Food Chemistry**, v. 107, p. 1485–1493, 2008.
- DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoleico e método de sequestro de radicais DPPH•. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.
- EL-BAKY, H. H. A.; EL-BAROTY, G. S. Characterization and bioactivity of phycocyanin isolated from *Spirulina* maxima grown under salt stress. **Food and Function**, v. 3, p. 381–388, 2012.
- ERDMANN, C; CHEUNG, B. W. Y.; SCHRÖDER, H. The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 19, p. 643–654, 2008.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Fishery & Aquaculture Statistics**, 2008. Disponível em: <http://www.fao.org/fishery/statistics/global-capture-production/query/en>. Acesso em: 29/10/2010.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Fishery & Aquaculture Statistics**, 2007. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/610/default.aspx#ancor>. Acesso em 27/10/2010.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The state of world fisheries and aquaculture**, 2012. Rome: FAO, 2012. 209p. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/016/i2727e/i2727e.pdf>. Acesso em: 23/08/2014.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The state of world fisheries and aquaculture**, 2014. Rome: FAO, 233p., 2014. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-i3720e.pdf>. Acesso em: 23/08/2014.
- FAULK, C. K.; HOLT, G. J. Biochemical composition and quality of captive-spawned cobia *Rachycentron canadum* eggs. **Aquaculture**, v. 279, p. 70–76, 2008.
- FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, p. 61-68, 1997.
- FERREIRA, I. C. F. R.; BAPTISTA, P.; VILAS-BOAS, M.; BARROS, L. Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. **Food Chemistry**, v. 100, p. 1511-1516, 2007.
- FIGUEIREDO, J. L.; MENEZES, N. A. **Manual de peixes marinhos do Sudeste do Brasil**. São Paulo: Museu de Zoologia/USP, 116p., 2000.
- FRILICH, I.; RIEDERER, P. Free radical mechanisms in dementia of Alzheimer type and the potential for antioxidative treatment. **Drug Research**, n. 45, p. 443-449, 1995.

GAD, A. S.; KHADRAWY, Y. A.; EL-NEKEETY, A. A.; MOHAMED, S. R.; HASSAN, N. S.; ABDEL-WAHAB, M. A. Antioxidant activity and hepatoprotective effects of whey protein and *Spirulina* in rats. **Nutrition**, p. 1–8, 2010.

GALLARATE, M.; CARLOTTI, M. E.; TROTTA, M.; BOVO, S. On stability of ascorbic acid in emulsified systems for tropical and cosmetic use. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 188, p. 233-241, 1999.

GEIRSDÓTTIR, M., Isolation, purification and investigation of peptides from fish proteins with blood pressure decreasing properties. **Food Research, Innovation & Safety**, v. 36, n. 9, p. 1-28, 2009.

GELANALYZER. Software Gel Analyzer versão 2010a. Disponível em: <http://www.gelalyzer.com/>.

GIBBS, B. F.; ZOUGMAN, A.; MASSE, R.; MULLIGAN, C. Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food. **Food Research International**, v. 37, p. 123–131, 2004.

GILBERT, H. F.; Mc LEAN, V. M. Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**, v. 63, p. 69-172, 1990.

GUARIENTI, C.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. Capacidade antioxidante da microalga *Spirulina platensis* em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* submetidas ao estressor paraquat. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n. 1, p. 106-111, 2010.

GUÉRARD, F.; DECOURCELLE, N.; SABOURIN, C.; FLOCH-LAIZET, C.; LE GREL, L.; LE FLOCH, P.; GOURLAY, F.; LE DELEZIR, R.; JAOUEN, P.; BOURSEAU, P. Recent developments of marine ingredients for food and nutraceutical applications: a review. **Le Journal des Sciences Halieutique et Aquatique**, v. 2, p. 21-27, 2010.

GUERARD, F.; DUFOSSÉ, L.; DE LA BROISE, D.; BINET, A. Enzymatic hydrolysis of proteins from yellowfin tuna (*Thunnus albacores*) wastes using Alcalase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, p. 1051-1059, 2001.

GUÉRARD, F.; GUIMAS, L.; BINET, A. Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 19, n. 20, p. 489–498, 2002.

GUERARD, F.; SUMAYA-MARTINEZ, M. T.; LAROQUE, D.; CHABEAUD, A.; DUFOSSÉ, L. Optimization of free radical scavenging activity by response surface methodology in the hydrolysis of shrimp processing discards. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 1486–1491, 2007.

GUO, H.; KOUZUMA, Y.; YONEKURA, M. Structures and properties of antioxidative peptides derived from royal jelly protein. **Food Chemistry**, v. 113, p. 238–245, 2009.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3rd Ed, Oxford: Oxford University Press, 2007

- HARMAN, L. C.; MOTTLEY, C.; MASON, R. P. Free radical metabolites of L-cysteine oxidation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 259, p. 5606–5611, 1984.
- 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.
- HASLER, C. M. Functional Foods: their role in disease prevention and health promotion. **Food and Technology**, v. 52, n.11, p.63-70, 1998.
- HASSLER, W. W.; RAINVILLE, R. P. **Techniques for hatching and rearing cobia, *Rachycentron canadum*, through larval and juvenile stages**. Univ. N. C. Sea Grant Coll. Prog. UNC-SG-75-30, 1975.
- HATTORI, M.; YAMAJI-TSUMAMOTO, K.; KUMAGAI, H.; FENG, Y.; TAKAHASHI, K. Antioxidative activity of soluble elastin peptides. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 46, p. 2167–2170, 1998.
- HENRIQUES, J. A. P.; DAFRÉ, A. L.; PICADA, J. N.; MARIS, A. F.; SALVADOR, M. Espécies reativas de oxigênio e avaliação de antioxidantes em sistemas biológicos. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. (Eds.) **Biotecnologia na Agricultura e na Agroindústria**. Guaíba: Agropecuária, v.1, p. 227-252, 2001.
- HERNANDEZ-LEDESMA, B.; DAVALOS, A.; BARTOLOMÉ, B.; AMIGO, L. Preparation of an enzymatic hydrolysates from α -Lactalbumin and β -Lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 53, p. 588–593, 2005.
- HIDALGO, M. E.; DAROIT, D. J.; CORREA, A. P. F.; PIENIZ, S.; BRANDELLI, A.; RISSO, P. H. Physicochemical and antioxidant properties of bovine caseinate hydrolysates obtained through microbial protease treatment. **International Journal of Dairy Technology**, v. 65, n. 3, 2012.
- HILGEMANN, M. **Avaliação da capacidade antioxidante *in vitro* e *in vivo* contra radicais peroxila e hidroxila em amostras de plantas medicinais**. Tese (Doutorado em Química) – Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.
- HIRANO, T.; NAKAMURA, H.; SUYAMA, M. Quality of wild and cultured ayu-I I. Seasonal variation of proximate composition. **Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish**, v. 46, p. 75-78, 1980.
- HOGAN, S.; ZHANG, L.; LI, J.; WANGA, H.; ZHOU, K. Development of antioxidant rich peptides from milk protein by microbial proteases and analysis of their effects on lipid peroxidation in cooked beef. **Food Chemistry**, v. 117, p. 438–443, 2009.
- HOYLE, N. T.; MERRITT, J. H. Quality of Fish Protein Hydrolysates from Herring (*Clupea harengus*). **Journal Food Science**, v. 59, p. 76-79, 1994.
- JE, J. Y.; LEE, K. H.; LEE, M. H.; AHN, C. B Antioxidant and antihypertensive protein hydrolysates produced from tuna liver by enzymatic hydrolysis. **Food Research International**, v. 42, p. 1266–1272, 2009.

JE, J. Y.; PARK, P. J.; KIM, S. K. Antioxidant activity of a peptide isolated from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate. **Food Research International**, v. 38, p. 45–50, 2005.

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.

JUN, S. Y.; PARK, P. J.; JUNG, W. K.; KIM, S. K. Purification and characterization of an antioxidative peptide from enzymatic hydrolysate of yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein. **European Food Research and Technology**, v. 219, p. 20–26, 2004.

JUNG, W.-K.; KARAWITA, R.; HEO, S.-J., LEE, B.-J.; KIM, S.-K.; JEON, Y.-J. Recovery of a novel Ca-binding peptide from Alaska Pollack (*Theragra chalcogramma*) backbone by pepsinolytic hydrolysis. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 2097–2100, 2006.

KAISER, J. B.; HOLT, G. J. Species profile cobia. **Southern Regional Aquaculture Center**, v. 6, p. 7202, 2005.

KAMAL, S. M; LU, R. R. The effect of enzymes and hydrolysis conditions on degree of hydrolysis and DPPH radical scavenging activity of whey protein hydrolysates. **Current Research in Dairy Sciences**, v. 3, n. 1, p. 25-35, 2011.

KELLEHER, K. Discards in the world's marine fisheries. An update. **FAO Fisheries Technical Paper**. n. 470. Rome:vFAO, 131p., 2005.

KIM, E. K.; LEE, S. J.; JEON, B. T.; MOON, S. H.; KIM, B.; 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, p. 1365–1370, 2009.

KIM, G. N.; JANG, H. D.; KIM, C. I. Antioxidant capacity of caseinophosphopeptides prepared from sodium caseinate using Alcalase. **Food Chemistry**, v. 104, p. 1359–1365, 2007.

KIM, S. Y.; JE, J. Y.; KIM, S. K. Purification and characterization of antioxidant peptide from hoki (*Johnius belengerii*) frame protein by gastrointestinal digestion. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 18, n.1 p. 31-38, 2007.

KORHONEN, H; PIHLANTO, A. Food-derived bioactive peptides: opportunities for designing future foods. **Current Pharmaceutical Design**, v. 9, n. 16, p. 1297-1308, 2003.

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.

KULISIC, T.; RADONIC, A.; KATALINIC, V.; MILOS, M. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. **Food Chemistry**, v. 85, p. 633–640, 2004.

KUNST, T. **Protein modification in optimize functionality: protein hydrolysates**. In: Whitaker J, Voragen A, Wong D, editors. Handbook of food enzymology. New York: Marcel Dekker. p 222-236, 2003.

- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LAHL, W. J.; BRAUN, S. D. Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. **Food Technology**, v. 48, n. 10, p. 68, 1994.
- LEE, B. J.; HENDRICKS, D. G. Antioxidant effects of L-carnosine on liposomes and beef homogenates. **Journal Food Science**, v. 62, p. 931-934, 1997.
- LI, B.; CHEN, F.; WANG, X.; JI, B.; WU, Y. Isolation and identification of antioxidative peptides from porcine collagen hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization–mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 102, p.1135–1143, 2007.
- LI, Y.; JIANG, B.; ZHANG, T.; MU, W.; LIU, J.; Antioxidant and free radical-scavenging activities of chickpea protein hydrolysate (CPH). **Food Chemistry**, v. 106, p. 444–450, 2008.
- LIAO, I. C.; HUANG, T. S.; TSAI, T. S.; HSUEH, S. M.; CHANG, S. L.; LEAÑO, E. M. Cobia culture in Taiwan: current status and problems. **Aquaculture**, v. 237, p. 155–165, 2004.
- LICEAGA-GESUALDO, A. M.; LI-CHAN, E. C. Y. Functional properties of fish protein hydrolysate from herring (*Clupea harengus*). **Journal Food Science**, v. 64, p. 1000-1004, 1999.
- LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.
- LIU, S. C.; LI, D. T.; HONG, P. Z.; ZHANG, C. H.; JI, H. W.; GAO, J. L.; ZHANG, L. Cholesterol, lipid content, and fatty acid composition of different tissues of farmed cobia (*Rachycentron canadum*) from China. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 86, p. 1155–1161, 2009.
- LOBO, V.; PATIL, A.; PHATAK, A.; CHANDRA, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacognosy Reviews**, v. 4, n. 8, p. 118-26, 2010.
- 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, p. 265–275, 1951.
- MADHAVI, D. L.; DESHPANDE, S. S.; SALUNKHE, D. K. **Food antioxidants: Technological, toxicological**. Health perspective. New York: Marcel Dekker, 1996.
- MAGER, W. H.; WINDERICHX, J. Yeast as a model for medical and medicinal research. **TRENDS in Pharmacological Sciences**, v. 26, n. 5, p. 265-273. 2005.
- MARIANI, D. **Citotoxicidade e função do sistema de defesa antioxidante durante a exposição a cisplatina no modelo *Saccharomyces cerevisiae***. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Departamento de Bioquímica do Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

- MARIUTTI, L. R. B.; BRAGAGNOLO, N. A oxidação lipídica em carne de frango e o impacto da adição de sálvia (*Salvia officinalis*, L.) e de alho (*Allium sativum*, L.) como antioxidantes naturais. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 68, n. 1, p. 1-11, 2009.
- MARONA, H. R. N; LUCCHESI, M. B. B. Protocol to refine intestinal motility test in mice. **Laboratory animals**, v. 38, p. 257-60, 2004.
- MARONA, H. R. N; LUCCHESI, M. B. B. Refining the intestinal motility test in mice to reduce animal stress. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, v. 24, n. 1, p. 79-82, 2003.
- MARQUÉZ, M. C.; VASQUÉS, M. A. Modeling of enzymatic protein hydrolysis. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 111–117, 1999.
- MARTINS, V. G. J.; COSTA, A. V.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Hidrolisado proteico de pescado obtido por vias química e enzimática a partir de corvina (*Micropogonias furnieri*). **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 61-66, 2009.
- MARTORELL, P.; FORMENT, J. V.; De LLANOS, R.; MONTÓN, F.; LLOPIS, S.; GONZÁLEZ, N.; GENOVÉS, S.; CIENFUEGOS, E.; MONZÓ, H.; RAMÓN, D. Use of *Saccharomyces cerevisiae* and *Caenorhabditis elegans* as model organisms to study the effect of cocoa polyphenols in the resistance to oxidative stress. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 2077–2085, 2011.
- MATSUSHITA, S.; KOBAYASHI, M.; NITTA, Y. Inactivation of enzymes by linoleic acid hydroperoxides and linoleic acid. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 34, p. 817–824, 1970.
- MEISEL, H. Multifunctional peptides encrypted in milk proteins. **Biofactors**, v. 21, p. 55-61, 2004.
- MEISEL, H.; FITZGERALD, R. J. Biofunctional peptides from milk proteins: mineral binding and cytomodulatory effects. **Current Pharmaceutical Design**, v. 9, p. 1289–1295, 2003.
- MELLO, L. D.; PINHEIRO, M. F. Aspectos físico-químicos de azeites de oliva e de folhas de oliveira provenientes de cultivares do RS, BRASIL. **Alimentos e Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 537-548, 2012.
- MENDIS, E.; RAJAPAKSE, N.; KIM, S. Antioxidant properties of a radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 53, p. 581–587, 2005.
- MILARDOVIC, S.; IVEKOVIC, D.; GRABARIC, B. S. A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical. **Bioelectrochemistry**, v. 68, p. 175-180, 2006.
- MIRET, S.; GROENE, E. M.; KLAFFKE, W. Comparison of in vitro assays of cellular toxicity in the human hepatic cell line HepG2. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 11, p. 184–193, 2006.
- MOHR, V. Enzymes technology in the meat and fish industries. **Process Biochemistry**, v. 80, p. 18-28 e 32, 1980.

MORALES, M. M. Métodos alternativos à utilização de animais em pesquisa científica: mito ou realidade? **Ciência e Cultura**, v.60, n. 2, 2008.

MORISHITA, T.; UNO, K.; IMURA, N.; TAKAHASHI, T. Variation with growth in the proximate compositions of cultured red sea bream. **Nippon Suisan Gakkaishi**, v. 53, p. 1601-1607, 1987.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55–63, 1983.

MOURE, A.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C. Antioxidant properties of ultrafiltration-recovered soy protein fractions from industrial effluents and their hydrolysates. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 447–456, 2006.

MYHRE, O.; FONNUM, F. The effect of aliphatic, naphthenic, and aromatic hydrocarbons on production of reactive oxygen species and reactive nitrogen species in rat brain synaptosome fraction: the involvement of calcium, nitric oxide synthase, mitochondria and phospholipase A. **Biochemical Pharmacology**, v. 62, p. 119-128, 2001.

NASCIMENTO, R. J.; ARAÚJO, C. R.; MELO, E. A. Atividade antioxidante de extratos de resíduo agroindustrial de goiaba (*Psidium guajava L.*). **Alimentos e Nutrição**, v. 21, n. 2, p. 209-216, 2010.

NAZEER, R. A.; DEEPTHA, R.; JAIGANESH, R.; SAMPATHKUMAR, N. S.; NAQASH, S. Y. Radical scavenging activity of seela (*Sphyraena barracuda*) and ribbon fish (*Lepturacanthus savala*) backbone protein hydrolysates. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 17, p. 209–216, 2011.

NC-IUBMB – Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology, International Union of Biochemistry and Molecular Biology. **Enzyme Nomenclature**. San Diego: Academic Press, 1992.

NERI, D. F.; WIEGMANN, D.; STANNY, R. R.; SHAPPELL, S. A.; MCCARDIE, A.; MCKAY, D. L. The effects of tyrosine on cognitive performance during extended wakefulness. **Aviation, Space, and Environmental Medicine**, v. 66, n. 4, p. 313–319, 1995.

NGO, D.-H.; QIAN, Z.-J.; RYU, B.; PARK, J. W.; KIM, S.-K. *In vitro* antioxidant activity of a peptide isolated from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) scale gelatin in free radical mediated oxidative systems. **Journal of Functional Foods**, v. 2, p. 107-117, 2010.

NGUYEN, H. T. M.; SYLLA, K. S. B.; RANDRIAMAHATODY, Z.; DONNAY-MORENO, C.; MOREAU, J.; TRAN, L. T.; BERGÉ, J. P. Enzymatic hydrolysis of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) by-products using Protamex protease. **Food Technology and Biotechnology**, v. 49, n. 1, p. 48–55, 2011.

NGUYEN, M. V.; RONNESTAD, I.; BUTTLE, L.; LAI, H. V.; ESPE, M. Evaluation of a high plant protein test diet for juvenile cobia *Rachycentron canadum* in comparison to commercial diets. **Journal of Agricultural and Crop Research**, v. 2, n. 6, p. 117-125, 2014.

NOGUEIRA, A. M. P.; VENTURINI FILHO, W. G. Ultra and microfiltration of west indian cherry liqueur. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 8, n. 4, p. 305-311 2004.

OESTERLING, M. Cultured cobia satisfy tastebuds. **Virginia Marine Resources Bulletin**, v. 33, n. 2, p. 23, 2001.

OETTERER, M. **Apostila de Tecnologia do Pescado**. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. USO, 1996.

OETTERER, M. **Produtos Obtidos por Interferência na Fração Protéica do Pescado**. Piracicaba: ESALQ, 2001.

OKUYAMA, M.; LAMAN, H.; KINGSBURY, S. R.; VISINTIN, C.; LEO, E.; EWARD, K. L.; STOEBER, K.; BOSHOFF, C.; WILLIAMS, G. H.; SELWOOD, D. L. Small-molecule mimics of an α -helix for efficient transport of proteins into cells. **Nature Methods**, v. 4, n. 2, p. 153-159, 2007.

OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p.689-702, 2009.

OLIVEIRA, C. F.; COLETTI, D.; CORREA, A. P. F.; DAROIT, D. J.; TONIOLO, R., CLADERA-OLIVERA, F.; BRANDELLI, A. Antioxidant activity and inhibition of meat lipid oxidation by soy protein hydrolysates obtained with a microbial protease. **International Food Research Journal**, v. 21, n. 2, p. 775-781, 2014.

OLIVEIRA-FILHO, P. R. C.; FÁVARO-TRINDADE, C. S.; TRINDADE, M. A.; CARVALHO BALIEIRO, J. C. C.; VIEGAS, E. M. M. Quality of sausage elaborated using minced Nile Tilapia submitted to cold storage. **Scientia Agricola**, v.67, n.2, p.183-190, 2010.

O'NEILL, L. M.; GALVIN, K.; MORRISSEY, P. A.; BUCKLEY, D. J. Comparison of effects of dietary olive oil, tallow and vitamin E on the quality of broiler meat products. **British Poultry Science**, v.39, p.365-371, 1998.

OSAWA, C. C.; FELÍCIO, P. E.; GONÇALVES, L. A. G. TBA test applied to meats and their products: traditional, modified and alternative methods. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 655-663, 2005.

OSAWA, T.; NAMIKI, M. Natural antioxidant isolated from eucalyptus leaf waxes. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 33, p. 770-780, 1985.

OTA - Office of Technology Assessment. **Alternatives to animal use in research, testing and education**. Ota Publ. N° OTA-BA-273. Washington DC. US. Government Printing Office, 1986.

OYAIZU, M. Studies on products of browning reaction antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucose-amine. **Japanese Journal of Nutrition**, v. 44, p. 307-315, 1986.

PACHECO, M. T. B.; AMAYA-FARFAN, J.; SGARBIERI, V. C. Partial characterization of a whey protein concentrate and its enzyme hydrolysates. **Journal of Food Biochemistry**, v. 26, p. 327-338, 2002.

- PANYAM, D.; KILARA, A. Enchanting the functionality of food proteins by enzymatic modification. **Trends in Food Science & Technology**, v.7, n.4, p.120-125, 1996.
- PARDI, M. C.; SANTOS, I. F. S.; SOUZA, E. R.; PARDI, H. S. **Ciência, higiene e tecnologia da carne**. Goiânia: CEGRAF-UFG, v. 1, cap. 2, p. 39-52, fundamentos da ciência da carne. 1995.
- PATTERSON, C. E.; RHOADES, R. A. Protective role of sulfhydryl reagents in oxidant lung injury. **Experimental Lung Research**, v. 14, Suppl, p.1005-19, 1988.
- PATTON, S.; KEENEY, M.; KURTZ G. W. Compounds producing the Kreis color reactions with particular reference to oxidized milk fat. **Journal American Oil Chemists' Society**, v. 28, p. 391, 1951.
- PEDROCHE, J.; YUST, M. M.; LQARI, H.; GIRÓN-CALLE, J.; VIOQUE, J.; ALAIZ, M.; MILLÁN, F. Production and characterization of casein hydrolysates with a high amino acid Fischer's ratio using immobilized proteases. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 527-533, 2004.
- PENA-RAMOS, E. A.; XIONG, Y. L. Antioxidant activity of soy protein hydrolysates in a liposomal system. **Journal of Food Science**, v. 67, p. 2952–2956, 2002.
- PIHLANTO, A. Antioxidative peptides derived from milk proteins. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 1306–1314, 2006.
- PIOTROWICZ, I. B. B. **Hidrolisados proteicos de anchoita (*Engraulis anchoita*): obtenção, atividade antioxidante e aplicação em embutido emulsionado**. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Escola de Química e Alimentos - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2012.
- POMATI, F.; COTSAPAS, C. J.; CASTIGLIONI, S.; ZUCCATO, E.; CALAMARI, D. Gene expression profiles in zebrafish (*Danio rerio*) liver cells exposed to a mixture of pharmaceuticals at environmentally relevant concentrations. **Chemosphere**, v. 70, p. 65–73, 2007.
- RABELLO-GAY, M. Z.; RODRIGUES, M. A. L. R.; MONTELEONE NETO, R. Mutagenesis, carcinogenesis and teratogenesis: evaluation methods and criterias. **Revista Brasileira de Genética**, v. 14, p. 83-85, 1991.
- RAJAPAKSE, N.; MENDIS, E.; BYUN, H. G.; KIM, S. K. Purification and *in vitro* antioxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative systems. **Journal of Nutrition Biochemistry**, v. 16, p. 562–569, 2005.
- RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.
- RANATHUNGA, S.; RAJAPAKSE, N.; KIM, S. K. Purification and characterization of antioxidative peptide derived from muscle of conger eel (*Conger myriaster*). **European Food Research Technology**, v. 222, n. 3-4, p. 310- 315, 2006.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 9/10, p. 1231–1237, 1999.

REN, J.; ZHAO, M.; SHI, J.; WANG, J.; JIANG, Y. Optimization of antioxidant peptide production from grass carp sarcoplasmic protein using response surface methodology. **LWT-Food Science and Technology**, v. 41, n. 9, p. 1624-1632, 2008.

RIBAS-FERREIRA, J. L.; LONNÉ, M. N.; FRANC, T. A.; MAXIMILLA, N. R.; LUGOKENSKI, T. H.; COSTA, P. G.; FILLMANN, G.; SOARES, F. A. A.; DE LA TORRE, F. R.; MONSERRAT, J. M. Co-exposure of the organic nanomaterial fullerene C₆₀ with benzo[a]pyrene in *Danio rerio* (zebrafish) hepatocytes: Evidence of toxicological interactions. **Aquatic Toxicology**, v. 147, p. 76– 83, 2014.

ROMAN, J. A.; SGARBIERI, V. C. Physical-chemical characterization of whey protein isolate and gelatin from bovine origin. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 10, n. 2, p. 137-143, 2007.

ROSSI, D. M. **Utilização de carne mecanicamente separada de frango para produção de um hidrolisado proteico a partir de enzimas microbianas**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Faculdade de Agronomia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.

ROSSINI, K.; NOREÑA, C. C. P. Z.; CLADERA-OLIVERA, F.; BRANDELLI, A. Casein peptides with inhibitory activity on lipid oxidation in beef homogenates and mechanically deboned poultry meat. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, p. 862–867, 2009.

RUSSEL, W. M. S.; BURCH, R. C. **The principles of humane experimental technique**. London: Methuen, 1959.

RUSTAD, T. Utilisation of marine byproducts. **Electronic Journal of Environmental and Agricultural Food Chemistry**, v. 2, n. 4, p. 458–463, 2003.

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

SAKANAKA, S.; TACHIBANA, Y.; ISHIHARA, N.; JUNEJA, L. Antioxidant properties of casein calcium peptides and their effects on lipid oxidation in beef homogenates. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 53, p. 464–468, 2005.

SAKANAKA, S.; TACHIBANA, Y.; ISHIHARA, N.; JUNEJA, L. R., Antioxidant activity of egg-yolk protein hydrolysates in a linoleic acid oxidation system. **Food Chemistry**, v. 86, p. 99–103, 2004.

SALÁN, E. O.; GALVÃO, J. A.; OETTERER, M. Use of smoking to add value to the salmoned trout. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 1, p. 57-62, 2006.

SANCHES, E. G.; VON SECKENDORF, R. W.; HENRIQUES, M. B.; FAGUNDES, L.; SEBASTIANI, E. F. viabilidade econômica do cultivo do bijupirá (*Rachycentron canadum*) em sistema *offshore*. **Informações Econômicas**, v. 38, n. 12, 2008.

- SANCHEZ-MORENO, C. Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Food Science Technology International**, v. 8, n. 3, p. 121–137, 2002.
- SANDRINI, J. Z.; BIANCHINI, A.; TRINDADE, G. S.; NERY, L. E. M.; MARINS, L. F. F. Reactive oxygen species generation and expression of DNA repair-related genes after copper exposure in zebrafish (*Danio rerio*) ZFL cells. **Aquatic Toxicology**, v. 95, p. 285–291, 2009.
- SANTOS, M. H.; BATISTA, B. L.; DUARTE, S. M. S.; ABREU, C. M. P.; GOUVÊA, C. M. C. P. Influence of processing and roasting on the antioxidant activity of coffee (*Coffea arabica*). **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 604-610, 2007.
- SARMADI, B. H.; ISMAIL, A. Antioxidative peptides from food proteins: a review. **Peptides**, v. 31, p. 1949-1956, 2010.
- SCHWARZ, M. H. Fingerling production still bottleneck for cobia culture. **Global Aquaculture Advocate**, v. 7, n. 1, p. 40–41, 2004.
- SELVAM, R.; DEVARAJ, S. Oxalate binding to rat kidney mitochondria: Induction by oxidized glutathione. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, v. 33, p. 62–65, 1996.
- SEOK, S. H.; PARK, J. H.; BAEKA, M. W.; LEE, H. Y.; KIMA, D. J.; UHMA, H. M.; HONGA, J. J.; NAA, Y. R.; JIN, B. H.; RYUB, D. Y.; PARK, J. H. Specific activation of the human HSP70 promoter by copper sulfate in mosaic transgenic zebrafish. **Journal Biotechnology**, v. 126, p. 406–413, 2006.
- SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos proteicos: propriedades, degradações e modificações**. São Paulo: Livraria Varela, 1996.
- SHIAU, C. Y.; PONG, Y. J.; CHIOU, K.; CHAI, T. Effect of growth on the levels of free histidine and amino acids in white muscle of milkfish (*Chanos chanos*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 6, p. 2103-2106, 1997.
- SHIMADA, K.; CHEFTEL, J. C. Sulfhydryl group/disulfide bond interchange reactions during heat-induced gelation of whey protein isolate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 37, p. 161-168, 1988.
- SHIMADA, K.; FUJIKAWA, K.; YAHARA, K.; NAKAMURA, T. Antioxidative properties of xanthan on the anti-oxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 945–948, 1992.
- SIGMA QUALITY CONTROL TEST PROCEDURE, product information, SSCASE01.001, 1999.
- SILVA, C. M. **Atividade antioxidante e antimicrobiana apresentada por peptídeos obtidos de subprodutos da corvina (*Micropogonias furnieri*)**. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de alimentos). Escola de Química e Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2014.

- SILVA, C. M.; FONSECA, R. A. S; PRENTICE, C. Comparing the hydrolysis degree of industrialization byproducts of Withemout croaker (*Micropogonias furnieri*) using microbial enzymes. **International Food Research Journal**, v. 21, n. 5, p. 1757-1761, 2014.
- SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v. 22, n. 1, p. 94-103, 1999.
- SILVA, J. F. X. **Produção e caracterização de hidrolisado proteico provenientes de resíduos de tilápia (*Oreochromis niloticus*)**. Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e Aquicultura) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2010.
- SOARES, D. G.; ANDREAZZA, A. C.; SALVADOR, M. Avaliação de compostos com atividade antioxidante em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, n. 1, 2005.
- SOARES, D. G.; ANDREAZZA, A. C.; SALVADOR, M. *Saccharomyces cerevisiae* as a biological model to evaluate the antioxidant capacity of compounds. **Revista Brasileira Farmacêutica**, v. 85, n. 2, p. 45-47, 2004.
- SOARES, D. G.; ANDREAZZA, A. C.; SALVADOR, M. Sequestering ability of butylated hydroxytoluene, propyl gallate, resveratrol, and vitamins C and E against ABTS, DPPH, and hydroxyl free radicals in chemical and biological systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 4, p. 1077-1080, 2003.
- SUETSUNA, K.; UKEDA, H.; OCHI, H. Isolation and characterization of free radical scavenging activity peptides derived from casein. **Journal Nutrition Biochemistry**, v. 11, p. 128-131, 2000.
- SUN, T.; TANUMIHARDJO, S. A. An integrated approach to evaluate food antioxidant capacity. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 9, p. 159-165, 2007.
- TACO – Tabela Brasileira de Composição de Alimentos/NEPA – UNICAMP. 4. ed. rev. e ampl. Campinas: NEPA – UNICAMP, 2011. 161p. Disponível em: http://www.unicamp.br/nepa/downloads/taco_4_edicao_ampliada_e_revisada.pdf. Acesso em 17 nov. 2012.
- THOMAS, J. R.; LOCKWOOD, P. A.; SINGH, A.; DEUSTER, P. A. Tyrosine improves working memory in a multitasking environment. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 64, n. 3, p. 495–500, 1999.
- THORKELSSON, G.; KRISTINSSON, H. G. Bioactive Peptides from Marine Sources. State of Art. Report to the NORA fund. **Matis-Food Research, Innovation, Safety**, p. 2009.
- TONIAL, I. B.; OLIVEIRA, D. F.; BRAVO, C. E. C. BRAVO; SOUZA, N. E.; MATSUSHITA, M. VISENTAINER, J. V. Caracterização físico-química e perfil lipídico do salmão (*Salmo salar l.*). **Alimentos e Nutrição**, v.21, n.1, p. 93-98, 2010.
- TORRES, E. A. F. S.; OKANI, E. T. Teste de TBA: ranço em alimentos. **Revista Nacional da Carne**, v. 243, p. 68-76, 1997.
- TRINDADE, G. S.; CAPELLA, M. A. M.; CAPELLA, L. S.; AFFONSO-MITIDIER, O. R.; RUMJANEK, V. M. Differences in sensitivity to UVC, UVB and UVA radiation of a

multidrug-resistant cell line overexpressing P-glycoprotein. **Photochemistry Photobiology**, v. 69, p. 694–699, 1999.

TSUGE, N.; EIKAWA, Y.; NOMURA, Y.; YAMAMOTO, M.; SUGISAWA, K. Antioxidant activity of peptides prepared by enzymatic hydrolysis of egg-white albumin. **Nippon Nogeikagaku Kaishi**, v. 65, p. 1635–1641, 1991.

UDENIGWE, C. C.; ALUKO, R. E. Chemometric analysis of the amino acid requirements of antioxidant food protein hydrolysates. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, p. 3148–3161, 2011.

WEIRICH, C. R.; WILLS, P. S.; BAPTISTE, R. M.; RICHE, M. A. Production characteristics and body composition of juvenile cobia fed three different commercial diets in recirculating aquaculture systems. **North American Journal of Aquaculture**, v. 72, n. 1, p. 43–49, 2010.

WILKINSON, A. L.; SUN, Q.; SENEAL, A.; FAUSTMAN, C. Antioxidant effects on TBARS and fluorescence measurements in freeze-dried meats. **Journal of Food Science**, v. 66, n. 1, p. 20–24, 2001.

WU, H.-C.; CHEN, H.-M.; SHIAU, C.-Y. 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.

YANG, B.; YANG, H.; LI, J.; LI, Z.; JIANG, Y. Amino acid composition, molecular weight distribution and antioxidant activity of protein hydrolysates of soy sauce lees. **Food Chemistry**, v. 124, p. 551–55, 2011.

YEN, G.-C.; CHEN, H.-Y. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 1455–1461, 1995.

YOU, H. J.; OH, D.-H.; CHOI, C. Y.; LEE, D. G.; HAHM, K.-S.; MOON, A. R.; JEONG, H. G. Protective effect of metallothionein-III on DNA damage in response to reactive oxygen species. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1573, p. 33–38, 2002.

YOU, L.; REGENSTEIN, J. M.; LIU, R. H. Optimization of hydrolysis conditions for the production of antioxidant peptides from fish gelatin using response surface methodology. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 6, p. C582–C587, 2010.

ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. P. **Biologia molecular** básica. 4 ed. – Porto Alegre: Artmed, 403p., 2012.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, v. 415, p. 389–395, 2002.

ZAVAREZE, E. R.; TELLES, A. C.; EL HALAL, S. L. M.; ROCHA, M.; COLUSSI, R.; ASSIS, L. M.; CASTRO, L. A. S.; DIAS, A. R. G.; PRENTICE, C. P. Production and characterization of encapsulated antioxidative protein hydrolysates from Whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*) muscle and byproduct. **LWT- Food Science and Technology**, v. 59, n.2, p. 841–848, 2014.

ZHANG, L.; JIANRONG, L; ZHOU, K. Chelating and radical scavenging activities of soy protein hydrolysates prepared from microbial proteases and their effect on meat lipid peroxidation. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 2084–2089, 2010.

ZHOU, Q.-C.; MAI, K.-S.; TAN, B.-P.; LIU, Y.-J. Partial replacement of fishmeal by soybean meal in diets for juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). **Aquaculture Nutrition**, v. 11, p. 175–182, 2005.

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

ZHU, L.; CHEN, J.; TANG, X.; XIONG, Y. L. Reducing, radical scavenging, and chelation properties of *in vitro* digests of alcalase-treated zein hydrolysate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 2714–2721, 2008.

ZHUANG, Y.; LI, B.; ZHAO, X. The scavenging of free radical and oxygen species activities and hydration capacity of collagen hydrolysates from walleye pollock (*Theragra chalcogramma*) Skin. **Journal of Ocean University of China (Oceanic and Coastal Sea Research)**, v. 8, p. 171-176, 2009.

ZHUANG, Y.-L.; SUN, L.-P.; ZHAO, X.; HOU, H.; LI, B.-F. Investigation of gelatin polypeptides of jellyfish (*Rhopilema esculentum*) for their antioxidant activity *in vitro*. **Food Technology and Biotechnology**, v. 48, n. 2, p. 222–228, 2010.

APÊNDICE 1

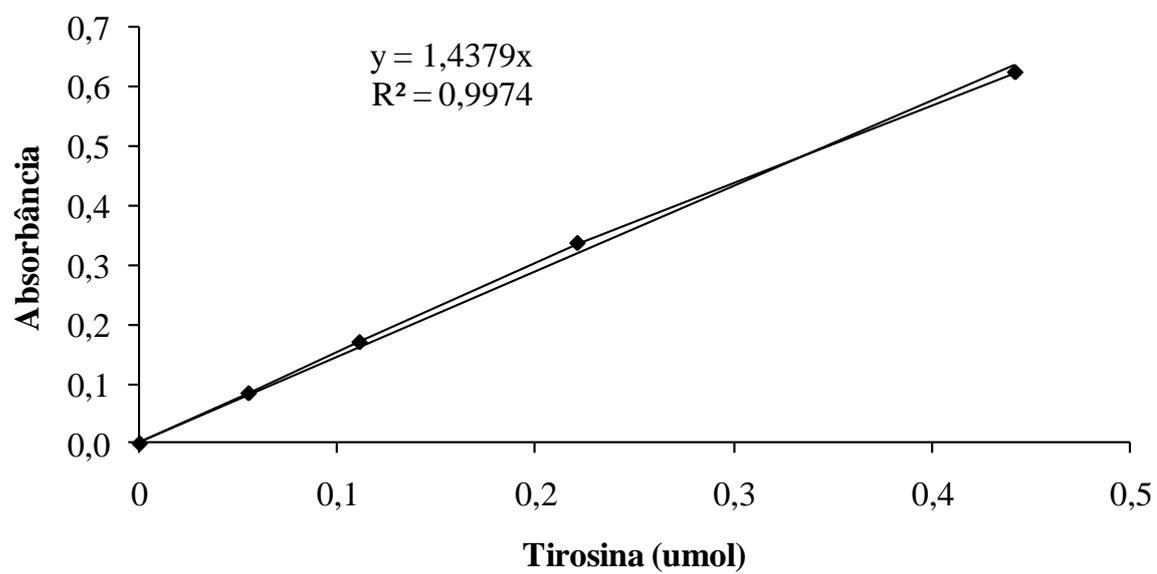
Atividade específica apresentada pelas enzimas Alcalase, Flavourzyme e Protamex, utilizadas no período de estudos da hidrólise.

Enzima	Atividade Específica (U/g de enzima)*
Alcalase	99,75
Flavourzyme	2,07
Protamex	8,41

* U corresponde a μmol de tirosina livre/min

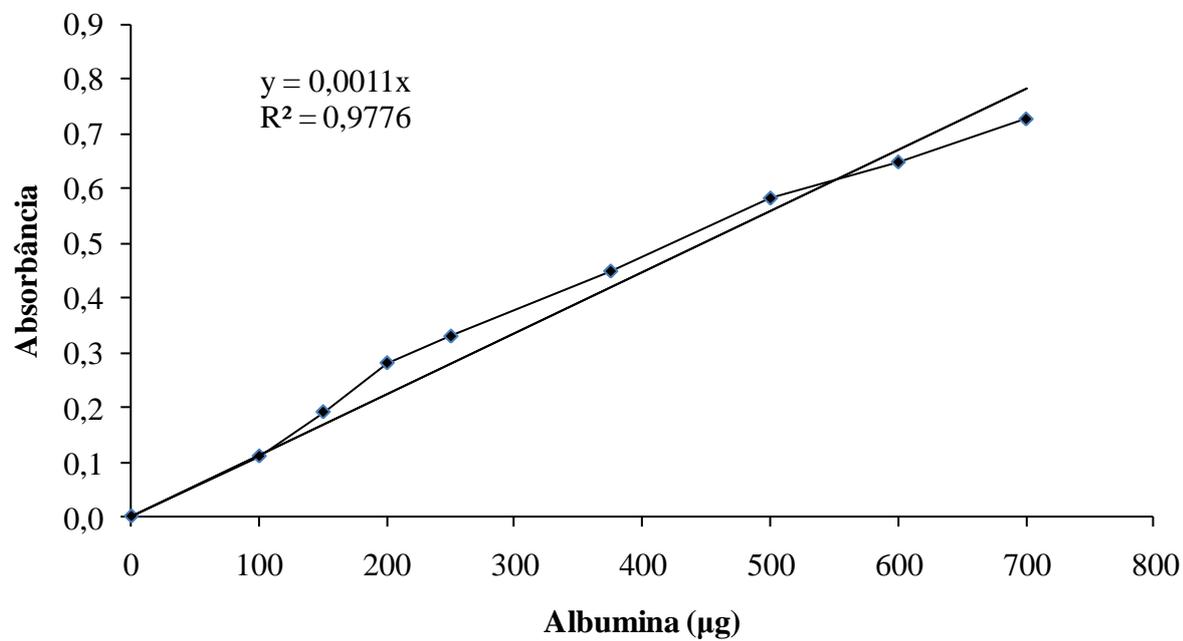
APÊNDICE 2

Curva padrão de tirosina, utilizada para os cálculos da atividade enzimática e atividade proteolítica específica (SIGMA, 1999).



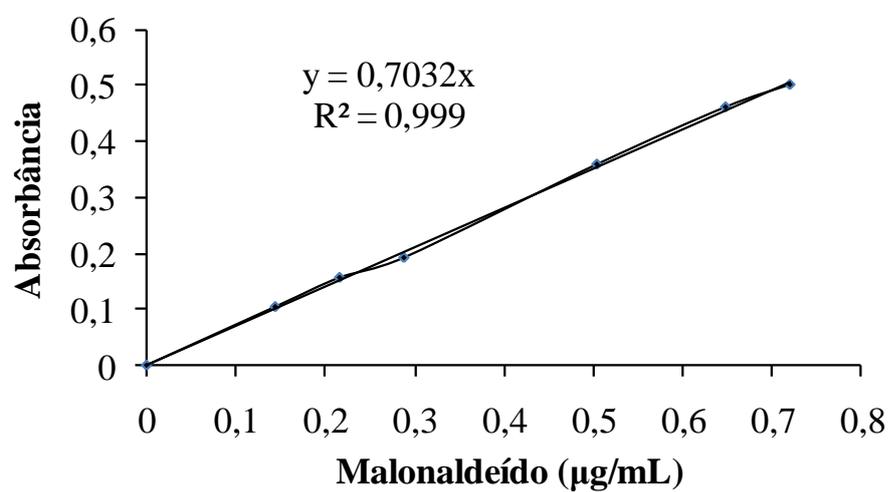
APÊNDICE 3

Curva padrão de albumina, utilizada para os cálculos da atividade enzimática e atividade proteolítica específica (LOWRY et al., 1951).



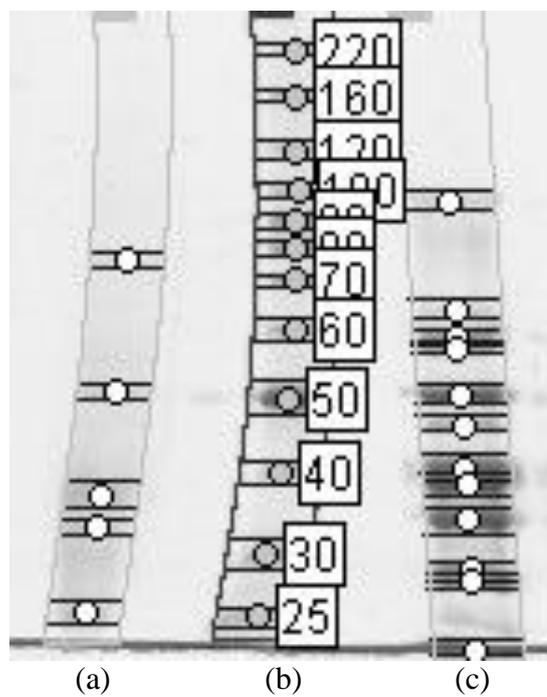
APÊNDICE 4

Curva padrão de malonaldeído, utilizada para os cálculos de TBARS em toucinho e carne moída.



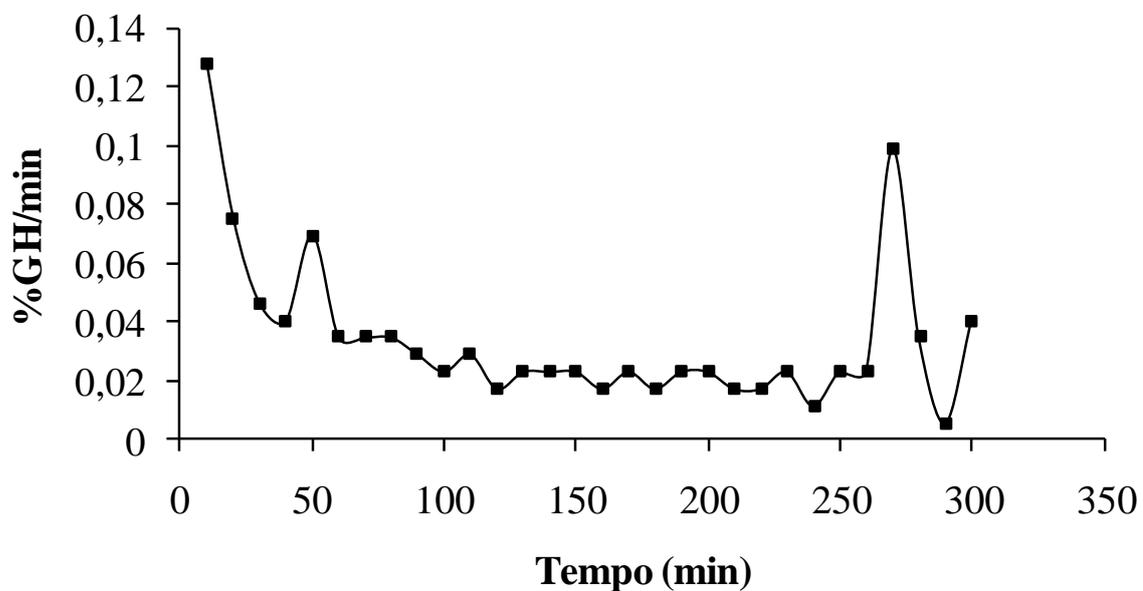
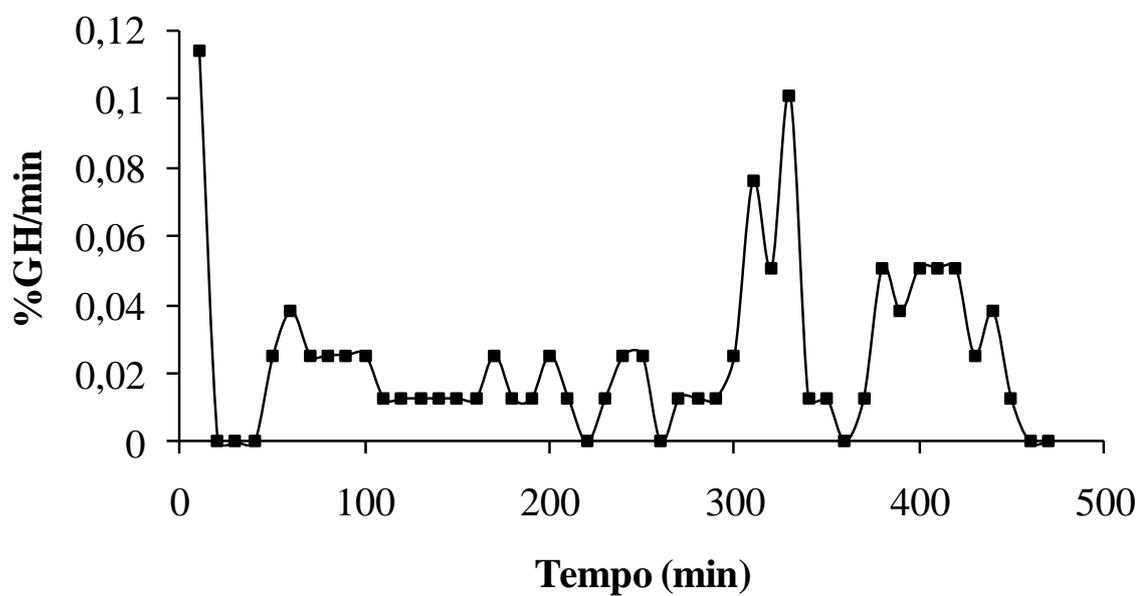
APÊNDICE 5

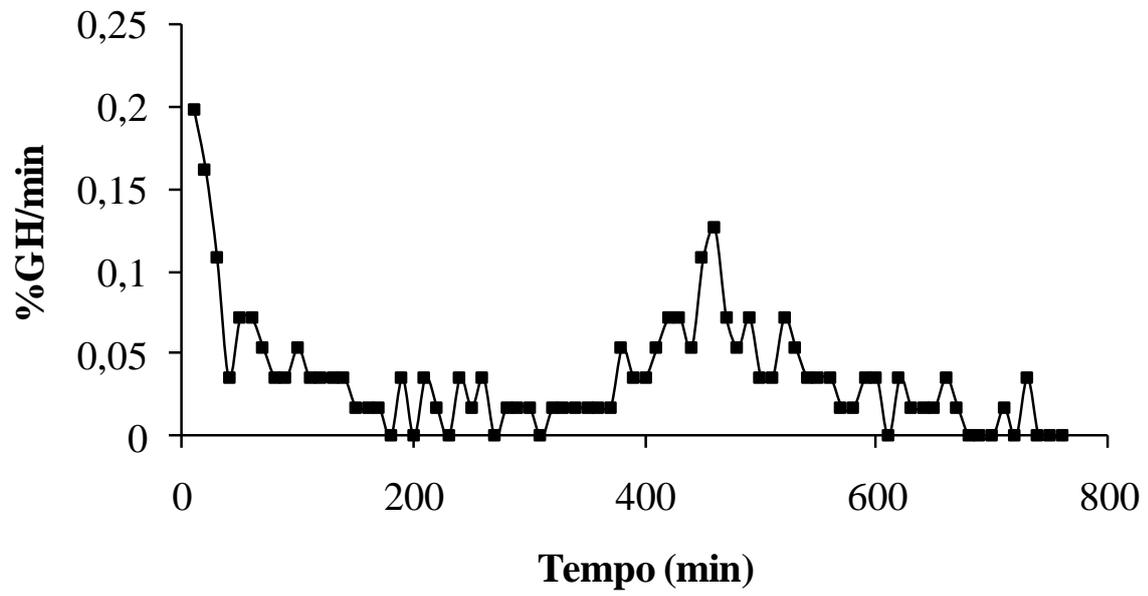
Perfil eletroforético com as bandas sinalizadas no padrão (b) pelo *software* GelAnalyzer (2010) das proteínas presentes no resíduo (a) e no músculo (c) do bijupirá.



APÊNDICE 6

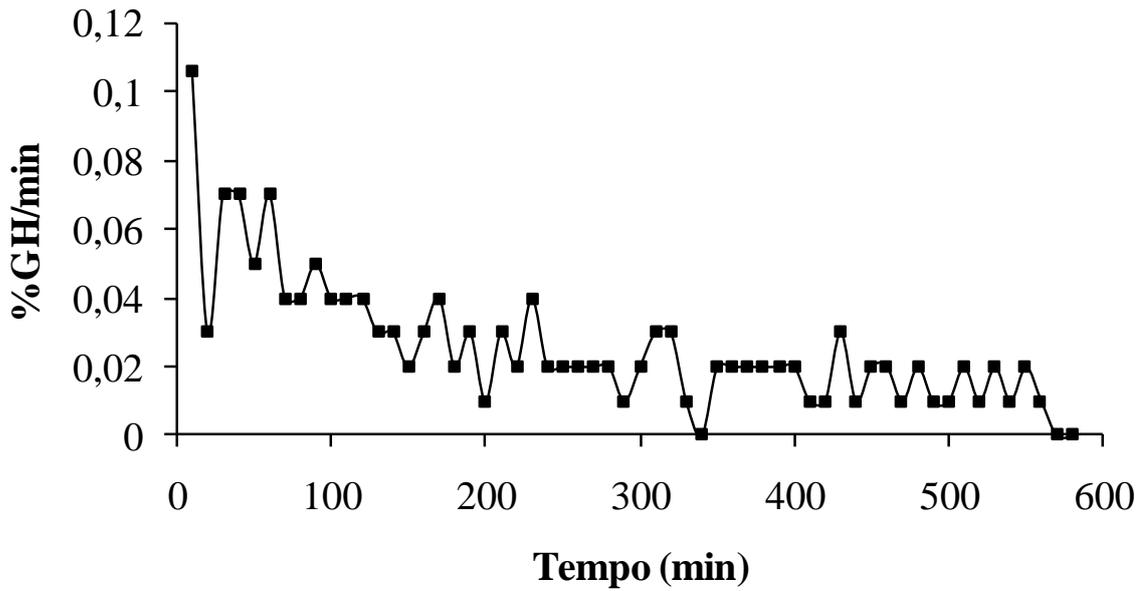
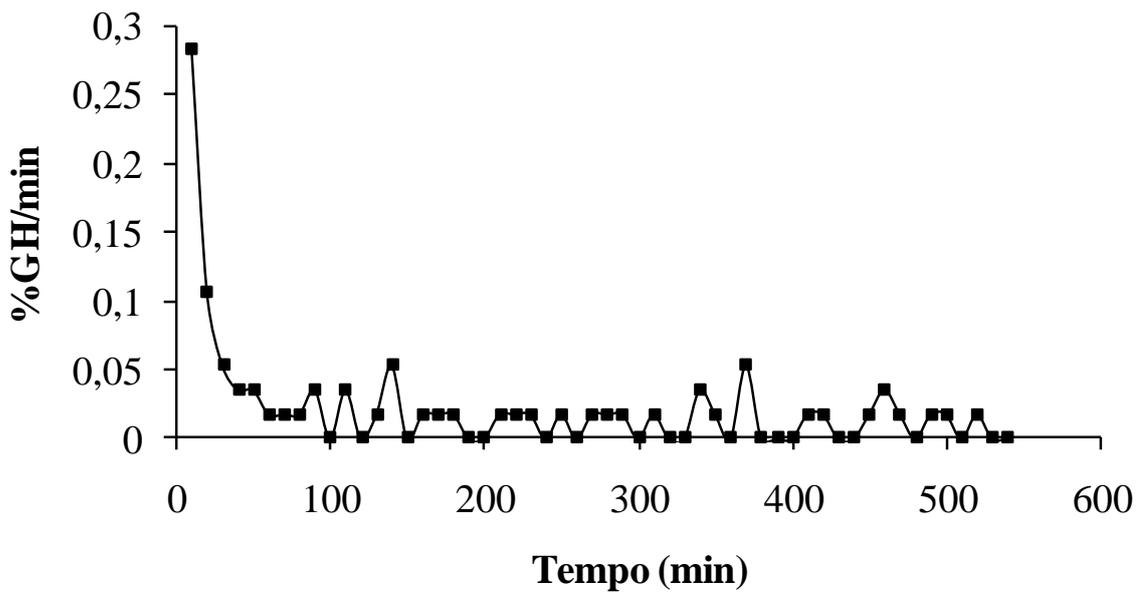
Taxa de %GH para os hidrolisados de músculo do bijupirá com Alcalase, Flavourzyme e Protamex.

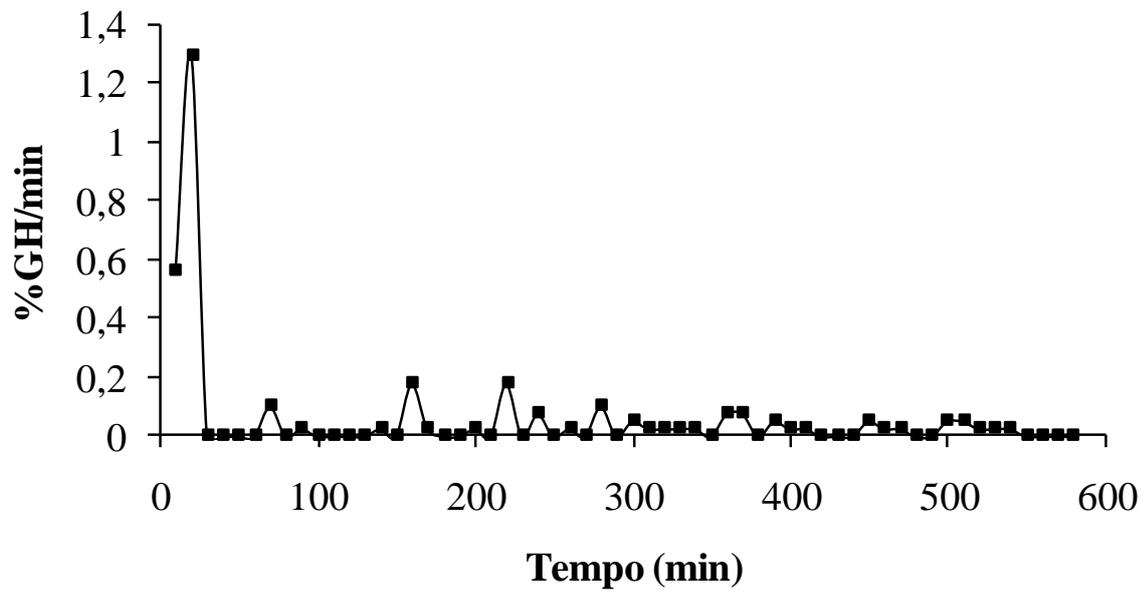
Alcalase**Flavourzyme**

Protamex

APÊNDICE 7

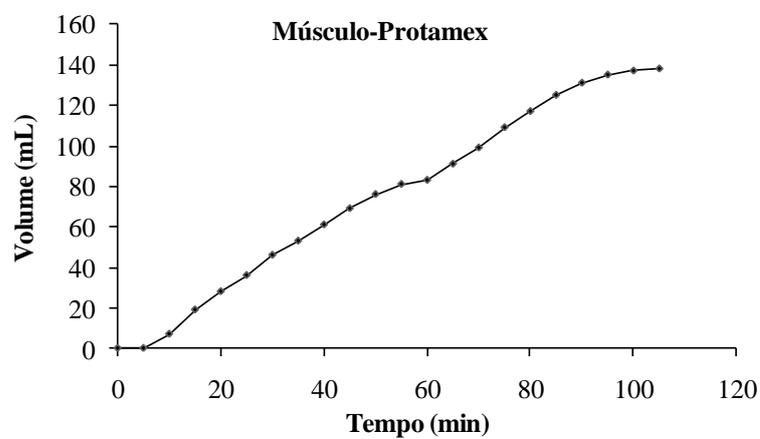
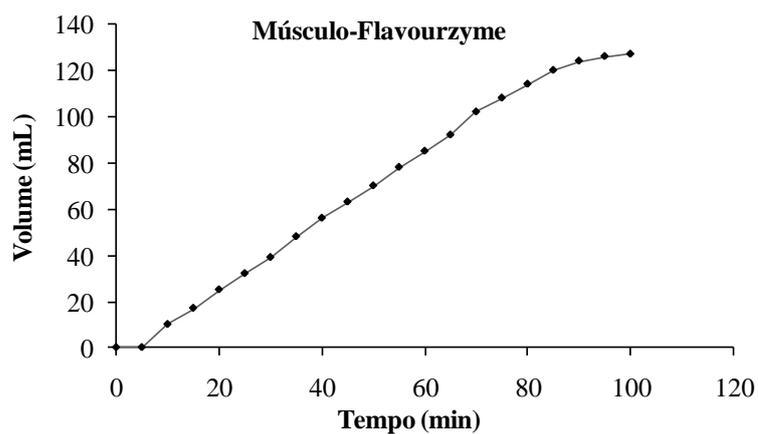
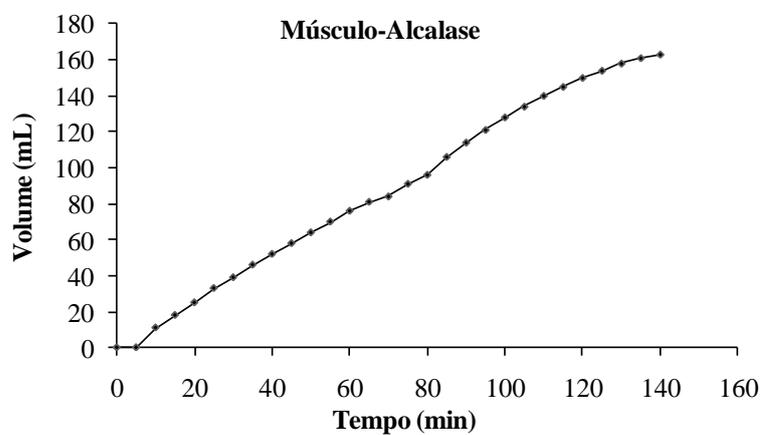
Taxa de %GH para os hidrolisados de resíduo do bijupirá com Alcalase, Flavourzyme e Protamex.

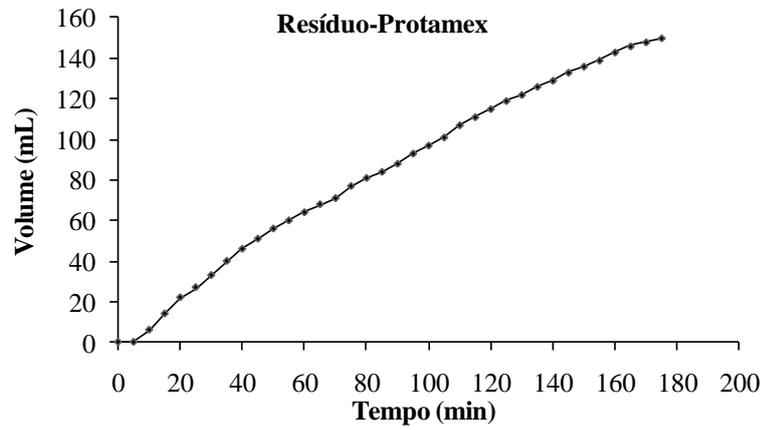
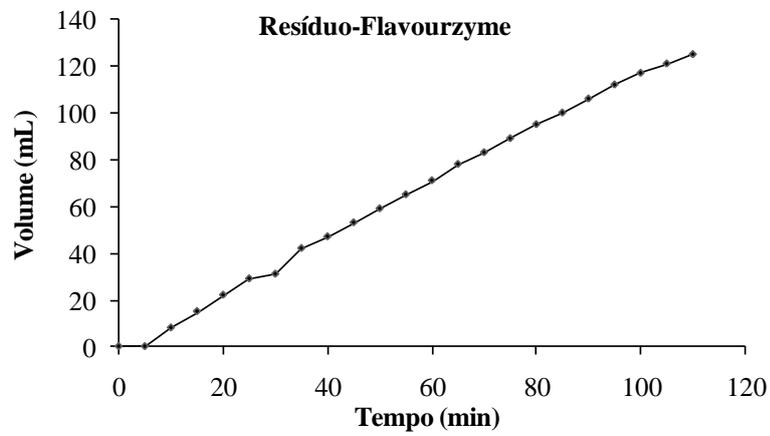
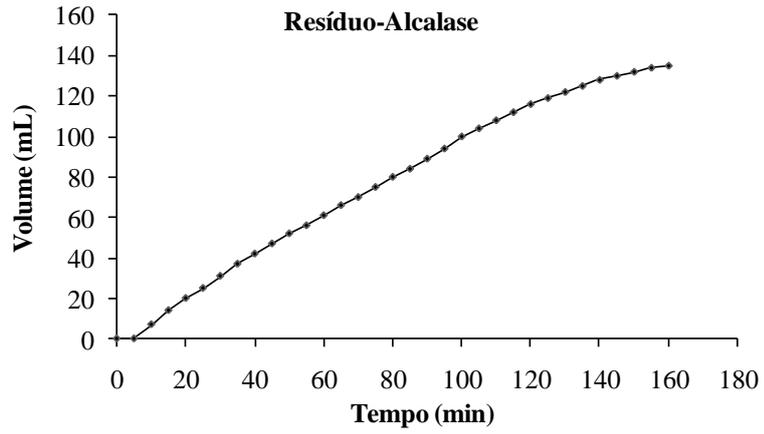
Alcalase**Flavourzyme**

Protamex

APÊNDICE 8

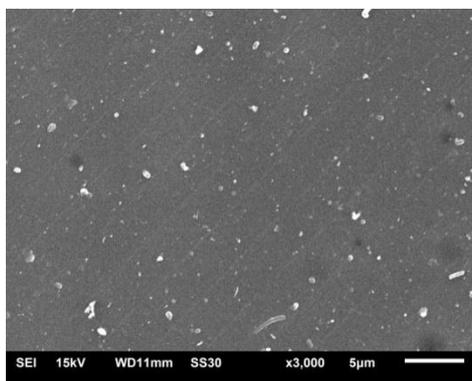
Cinética da Ultrafiltração dos hidrolisados de músculo e resíduo de bijupirá com Alcalase, Flavourzyme e Protamex com membranas de 3 kDa (volume x tempo).



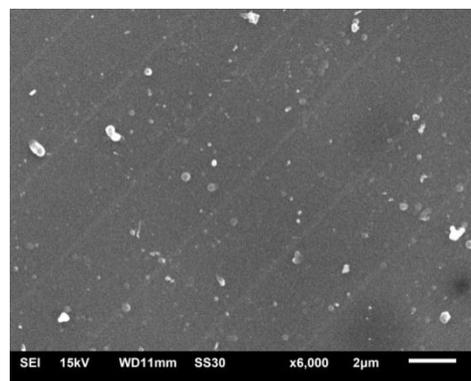


APÊNDICE 9

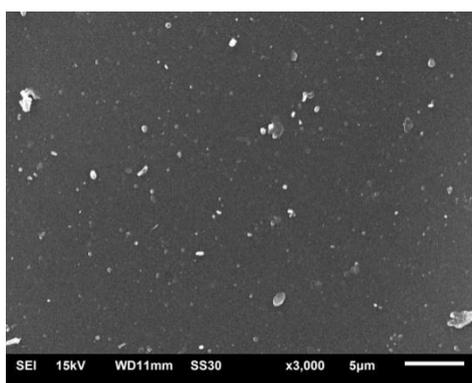
Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para as membranas de 3 kDa utilizadas na UF de hidrolisados de resíduo e músculo do bijupirá com aumento de 3000 e 6000x, sendo membranas novas, e após 1 e 2 usos.



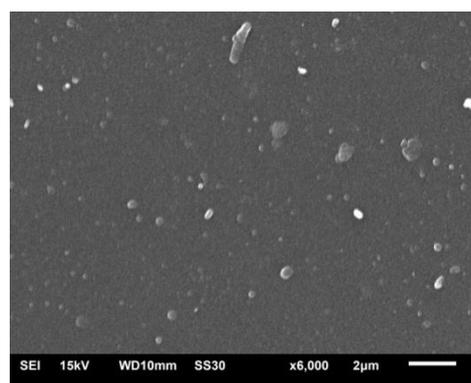
Nova- 3000x



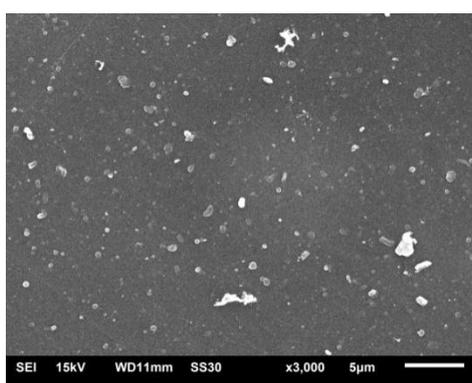
Nova- 6000x



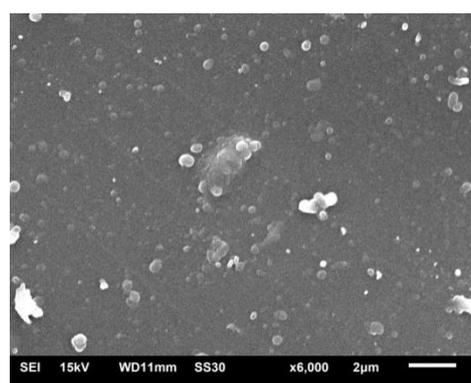
Usada uma vez- 3000x



Usada uma vez- 6000x



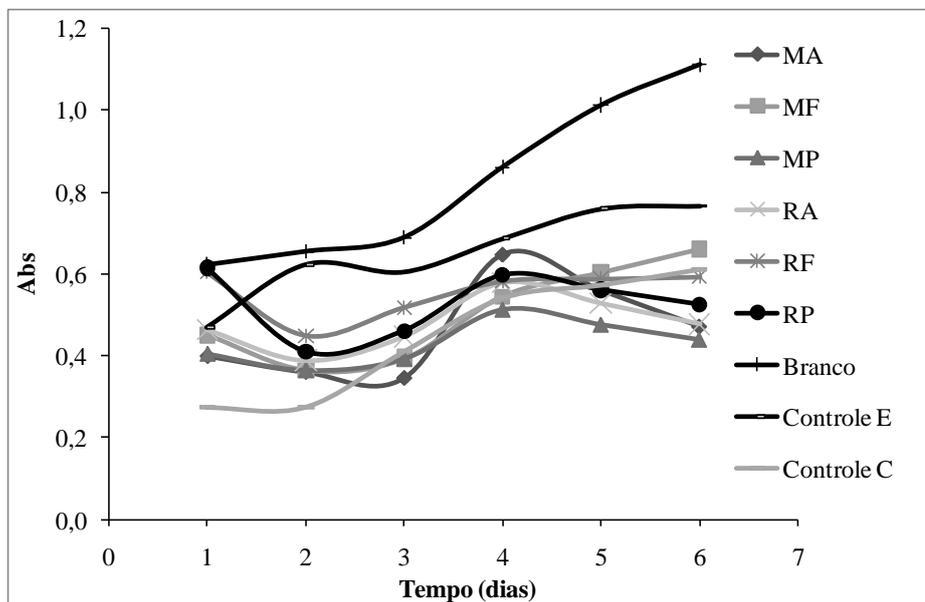
Usada duas vezes- 3000x



Usada duas vezes- 6000x

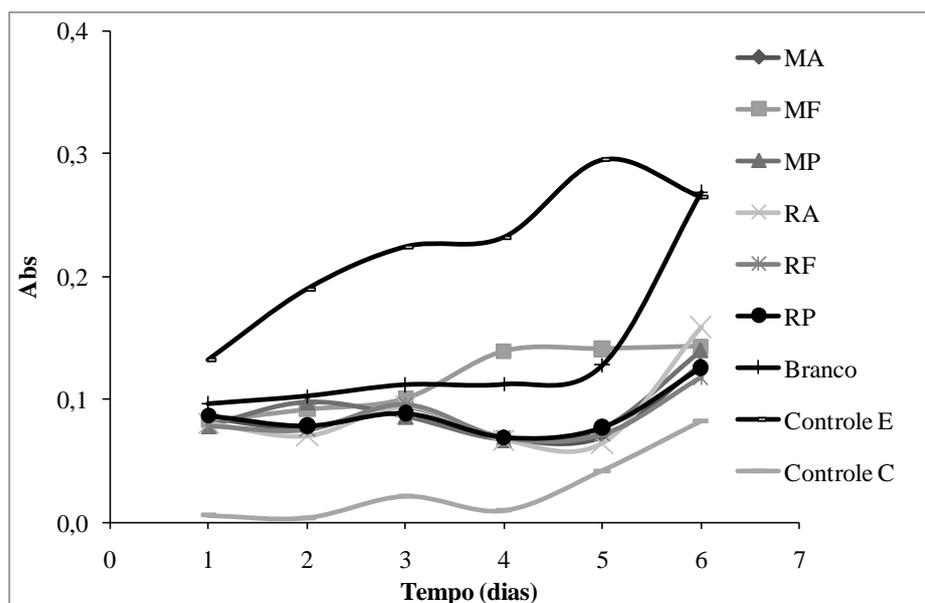
APÊNDICE 10

Cinética da peroxidação lipídica do ácido linoleico com hidrolisados de músculo e resíduo de bijupirá com Alcalase, Flavourzyme e Protamex integrais.



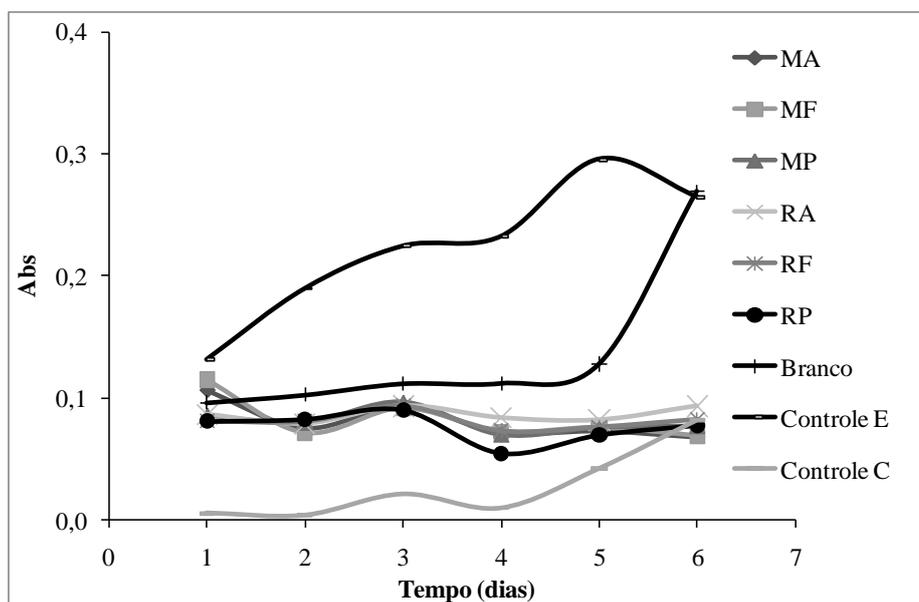
MA – hidrolisado do músculo com Alcalase; MF – hidrolisado do músculo com Flavourzyme; MP – hidrolisado do músculo com Protamex; RA – hidrolisado do resíduo com Alcalase; RF – hidrolisado do resíduo com Flavourzyme; RP – hidrolisado do resíduo com Protamex; Controle E – α -tocoferol; e Controle C – ácido ascórbico.

Cinética da peroxidação lipídica do ácido linoleico com hidrolisados de músculo e resíduo de bijupirá com Alcalase, Flavourzyme e Protamex nas frações peptídicas maiores que 3 kda.



MA – hidrolisado do músculo com Alcalase; MF – hidrolisado do músculo com Flavourzyme; MP – hidrolisado do músculo com Protamex; RA – hidrolisado do resíduo com Alcalase; RF – hidrolisado do resíduo com Flavourzyme; RP – hidrolisado do resíduo com Protamex; Controle E – α -tocoferol; e Controle C – ácido ascórbico.

Cinética da peroxidação lipídica do ácido linoleico com hidrolisados de músculo e resíduo de bijupirá com Alcalase, Flavourzyme e Protamex nas frações peptídicas menores que 3 kda.



MA – hidrolisado do músculo com Alcalase; MF – hidrolisado do músculo com Flavourzyme; MP – hidrolisado do músculo com Protamex; RA – hidrolisado do resíduo com Alcalase; RF – hidrolisado do resíduo com Flavourzyme; RP – hidrolisado do resíduo com Protamex; Controle E – α -tocoferol; e Controle C – ácido ascórbico.

ANEXO 1

SIGMA QUALITY CONTROL TEST
PROCEDURE

Product Information

Enzymatic Assay of PROTEASE¹
Casein as a Substrate

PRINCIPLE:



CONDITIONS: T = 37°C, pH = 7.5, A_{660nm}, Light path = 1 cm

METHOD: Colorimetric

REAGENTS:

- A. 50 mM Potassium Phosphate buffer, pH 7.5 at 37°C.
(Prepare 200 ml in deionized water using Potassium Phosphate, Dibasic, Trihydrate, Sigma Prod. No. P-5504. Adjust to pH 7.5 at 37°C with 1 M HCl.)
- B. 0.65% (w/v) Casein Solution (Casein)
(Prepare 125 ml in Reagent A using Casein, Sigma Prod. No. C-7078. Heat gently (do not boil) to 80-90°C for 10 minutes with stirring. Adjust the pH to 7.5 at 37°C, if necessary, with either 1 M NaOH or 1 M HCl.)
- C. 110 mM Trichloroacetic Acid Reagent (TCA)
(Dilute 9 ml of Trichloroacetic Acid, 6.1 N, approximately 100% (w/v), Sigma Stock No. 490-10, to 500 ml with deionized water.)
- D. Folin & Ciocalteu's Phenol Reagent (F-C)
(Dilute 10 ml of Folin & Ciocalteu's Phenol Reagent, Sigma Prod. No. F-9252, to 40 ml with deionized water.)
- E. 500 mM Sodium Carbonate Solution (Na₂CO₃)
(Prepare 500 ml in deionized water using Sodium Carbonate Anhydrous, Sigma Prod. No. S-2127.)
- F. 10 mM Sodium Acetate Buffer with 5 mM Calcium Acetate, pH 7.5 at 37°C (Enzyme Diluent)
(Prepare 100 ml in deionized water using Sodium Acetate, Trihydrate, Sigma Prod. No. S-8625, and Calcium Acetate, Sigma Prod. No. C-1000. Adjust the pH to 7.5 at 37°C with 0.1 M Acetic acid or 0.1 M NaOH.)

Enzymatic Assay of PROTEASE¹
Casein as a Substrate

REAGENTS: (continued)

- G. 1.1 mM L-Tyrosine Standard (Std Soln)
 (Prepare 100 ml in deionized water using L-Tyrosine, Free Base, Sigma Prod. No. T-3754.
 Heat gently (do not boil) until tyrosine dissolves and cool to room temperature.)
- H. Protease Enzyme Solution
 (Immediately before use, prepare a solution containing 0.1 - 0.2 unit/ml of Protease in cold
 Reagent F.)

PROCEDURE:

Pipette the following reagents into suitable vials (in milliliters):

	<u>Test</u>	<u>Blank</u>
Reagent B (Casein)	5.00	5.00

Equilibrate to 37°C. Then add:

Reagent H (Enzyme Solution)	1.00	-----
-----------------------------	------	-------

Mix by swirling and incubate at 37°C for exactly 10 minutes. Then add:

Reagent C (TCA)	5.00	5.00
Reagent H (Enzyme Solution)	-----	1.00

Mix by swirling and incubate at 37°C for about 30 minutes. Filter through Whatman #50 filter paper or a 0.45 µm filter and use the filtrate in color development.

COLOR DEVELOPMENT:

Standard Curve:

Prepare a standard curve by pipetting the following reagents into suitable vials (in milliliters):

	<u>Std 1</u>	<u>Std 2</u>	<u>Std 3</u>	<u>Std 4</u>	<u>Std Blank</u>
Reagent G(Std Soln)	0.05	0.10	0.20	0.40	0.00
Deionized Water	1.95	1.90	1.80	1.60	2.00
Reagent E(Na ₂ CO ₃)	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Reagent D (F-C)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

Enzymatic Assay of PROTEASE¹ Casein as a Substrate

COLOR DEVELOPMENT: (continued)

Sample:

Pipette the following reagents into 4 dram vials (in milliliters):

	Test	Blank
Test Filtrate	2.00	-----
Blank Filtrate	-----	2.00
Reagent E (Na ₂ CO ₃)	5.00	5.00
Reagent D (F-C)	1.00	1.00

Mix by swirling and incubate at 37°C for 30 minutes. Remove the vials and allow them to cool to room temperature. Filter through a 0.45 µm filter immediately prior to reading. Read the absorbance at 660nm for each of the vials in suitable cuvettes.

CALCULATIONS:

Standard Curve:

$$\Delta A_{660\text{nm}} \text{ Standard} = A_{660\text{nm}} \text{ Standard} - A_{660\text{nm}} \text{ Standard Blank}$$

Plot the $\Delta A_{660\text{nm}}$ Standard vs µmoles of Tyrosine.

Sample Determination:

$$\Delta A_{660\text{nm}} \text{ Sample} = A_{660\text{nm}} \text{ Test} - A_{660\text{nm}} \text{ Sample Blank}$$

Determine the µmoles of Tyrosine equivalents liberated using the Standard curve.

$$\text{Units/ml enzyme} = \frac{(\mu\text{mole Tyrosine equivalents released}) (11)}{(1) (10) (2)}$$

11 = Total volume (in milliliters) of assay

10 = Time of assay (in minutes) as per the Unit Definition

1 = Volume of enzyme (in milliliter) of enzyme used

2 = Volume (in milliliters) used in Colorimetric Determination

$$\text{Units/mg solid} = \frac{\text{units/ml enzyme}}{\text{mg solid/ml enzyme}}$$

Enzymatic Assay of PROTEASE¹ Casein as a Substrate

CALCULATIONS: (continued)

$$\text{Units/mg protein} = \frac{\text{units/ml enzyme}}{\text{mg protein/ml enzyme}}$$

UNIT DEFINITION:

One unit will hydrolyze casein to produce color equivalent to 1.0 μmole (181 μg) of tyrosine per minute at pH 7.5 at 37°C (color by Folin & Ciocalteu's reagent).

FINAL ASSAY CONCENTRATION:

In a 6.00 ml reaction mix, the final concentrations are 42 mM potassium phosphate, 0.54% (w/v) casein, 1.7 mM sodium acetate, 0.8 mM calcium acetate, and 0.1 - 0.2 unit protease.

REFERENCES:

Anson, M.L., (1938) *J. Gen. Physiol.* **22**, 79-89

Folin, O., and Ciocalteu, V., (1929) *J. Biol. Chem.* **73**, 627

NOTES:

1. This assay procedure is to be used to assay Protease, Sigma Prod. Nos.: P-4630, P-4755, P-0384, P-5380, P-7431, P-6141, P-1512, P-9040, P-5147, P-5647, P-8775, P-7026, P-4032, P-8038, P-8298, P-2789, P-4789, P-6670, P-3910, P 5459 and P-4806.
2. This assay is based on the cited references.
3. Where Sigma Product or Stock numbers are specified, equivalent reagents may be substituted.

Sigma warrants that the above procedure information is currently utilized at Sigma and that Sigma products conform to the information in Sigma publications. Purchaser must determine the suitability of the information and products for its particular use. Upon purchase of Sigma products, see reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.