



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

AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DE HIDROLISADOS E FRAÇÕES PEPTÍDICAS
DAS PROTEÍNAS PROVENIENTES DO SUBPRODUTO DO PROCESSAMENTO DE
ÓLEO DE CHIA (*Salvia hispanica* L)

MICHELE SILVEIRA COELHO

MYRIAM DE LAS MERCEDES SALAS MELLADO
Orientadora

RIO GRANDE, RS
2018



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

AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DE HIDROLISADOS E FRAÇÕES PEPTÍDICAS
DAS PROTEÍNAS PROVENIENTES DO SUBPRODUTO DO PROCESSAMENTO DE
ÓLEO DE CHIA (*Salvia hispanica* L)

MICHELE SILVEIRA COELHO

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

MYRIAM DE LAS MERCEDES SALAS MELLADO
Orientadora

RIO GRANDE, RS

2018

Ficha catalográfica

C672a Coelho, Michele Silveira.

Avaliação da bioatividade de hidrolisados e frações peptídicas das proteínas provenientes do subproduto do processamento de óleo de chia (*Salvia hispanica* L)/ Michele Silveira Coelho. – 2018. 166 p.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Rio Grande/RS, 2018.

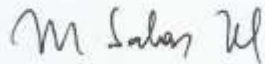
Orientadora: Dr^a. Myriam De Las Mercedes Salas Mellado.

1. Antioxidante 2. Antibacteriana 3. Farinha de chia
4. Funcionalidade 5. Hipocolesterolêmica 6. Peptídeos bioativos
I. Salas Mellado, Myriam De Las Mercedes II. Título.

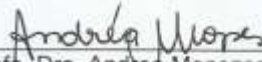
CDU 664

APROVAÇÃO

Tese defendida por Michele Silveira Coelho aprovada em 23 de março de 2018, pela Comissão Examinadora constituída pelos professores:



Profa. Dra. Myriam de las Mercedes Salas Mellado - FURG



Profa. Dra. Andrea Menezes Lopes - FURG



Prof. Dr. Eliezer Ávila Gandra - UFPel



Prof. Dr. Adriano Brandelli - UFRGS



Dra. Meritaine da Rocha - FURG

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Coelho e Ju, obrigada pelo apoio, amizade, carinho, amor e compreensão em todos os momentos. Pelas preocupações a cada recusa de um artigo e pelo apoio financeiro, que foi tão importante para o desenvolvimento desta tese.

Às minhas irmãs, Tati e Milena, que sempre estiveram presente, com amizade e carinho, incentivando o desenvolvimento desse trabalho.

À minha afilhada, Sophia, tão pequena, mas que transborda amor através do seu sorriso que esqueço de todos os problemas.

Ao Luis, conhecido como ‘Puff’, meu namorado, que vem me acompanhando e apoiando em cada etapa da minha vida com amor e solidariedade. Sempre me incentivando a seguir em frente e correr atrás dos meus objetivos.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Myriam Salas-Mellado, que desde a graduação está ao meu lado, agradeço pelo apoio, incentivo e amizade. Sua orientação e amizade foram essenciais para o meu crescimento profissional e pessoal.

Ao Prof. Dr. Carlos Prentice pelo apoio financeiro na aquisição do kit HMG-CoA redutase para a determinação da atividade hipocolesterolêmica.

À minha amiga que me acompanhou durante esta caminhada, Juliana Latorres, que seguiu comigo em outros caminhos: uma Especialização e a Formação Pedagógica. Sofremos e nos divertimos juntas durante todo esse período. Muito obrigada pela amizade e parceria.

Às minhas amigas: Aline, Beta, Cássia, Cris, Dani, Glaucia, Hannah, Jessica, Júlia (*in memoriam*), Michele, Natália e Vanessa que são as minhas guias. Obrigada pelos encontros divertidos, os conselhos e as grandes gargalhadas que vocês me proporcionam. Apesar do ano difícil que passamos, continuamos sendo firmes e fortes em nossas vidas.

Às minhas amigas Bruna, Caroline, Eduarda, Juliana, Máisa e Micha que mesmo às vezes sem entender, me apoiavam dizendo pra seguir em frente que no final tudo dará certo.

À todos os colegas do Laboratório de Tecnologia de Alimentos, especialmente Daiane, Gabiatti, Inajara, Janise, Paola, Sibeles e Viviane pela amizade, pela ajuda e pelos dias divertidos de trabalho. À Prof^a Dr^a Vilásia Martins pelo profissionalismo e auxílio quando solicitado.

À Sabrine, ex-técnica do laboratório, que muito me auxiliou para o desenvolvimento deste trabalho com dedicação e amizade. Foram muitos dias de testes e análises juntas. Muito obrigada por me proporcionar a tua amizade e conhecimento.

Às Pós-Doutoras, Michele e Meri, por todo o apoio e conhecimento transmitido durante este trabalho.

À Profª Drª Michele da Rosa Andrade Zimmermann de Souza que sempre me incentivou em nossas reuniões e encontros. Muito obrigada pelos teus conselhos e amizade.

Às empresas Cacália Produtos Naturais, localizada em Estância Velha, RS, Brasil e LNF Latino Americana, localizada em Bento Gonçalves, RS, Brasil por cederam o subproduto da produção do óleo de chia e as enzimas, respectivamente, utilizadas neste trabalho.

À técnica de laboratório Rosana Aparecida Manólio Soares Freitas e ao Prof. Dr. José Alfredo Gomes Áreas da Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, Departamento de Nutrição, por terem aberto as portas de seu laboratório para a realização da análise de atividade hipocolesterolêmica. Obrigada pela paciência e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Eliezer Ávila Gandra, que me orientou no curso de Especialização e cedeu seu laboratório de Ciência dos Alimentos e Biologia Molecular, no Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, para a realização das análises da atividade antibacteriana.

À Clarice Izumi do Centro de Química de Proteínas e Departamento de Biologia Celular, Molecular e Bioagentes Patogênicos, Centro Regional de Hemoterapia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo pela realização das análises de aminoácidos.

À todos os laboratórios da Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande.

À Universidade Federal do Rio Grande e aos professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos pelas oportunidades e apoios concedidos.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, especialmente à Islanda, pela colaboração.

Há mais pessoas que desistem do que pessoas que fracassam

Henry Ford

RESUMO

A produção industrial do óleo de chia é realizada por extração a frio da semente. Este processo gera resíduos, o subproduto, atualmente utilizado na fabricação de farinha de chia desengordurada e ração para animais, sendo produto de baixo custo. O objetivo deste estudo foi hidrolisar as proteínas provenientes do subproduto do óleo de chia e obter peptídeos com propriedades antioxidantes, antibacterianas e hipocolesterolêmicas. A farinha de chia parcialmente desengordurada (subproduto - CF) foi fornecida por uma empresa em Estância Velha, no RS. A partir dela foram obtidos os produtos: fração rica em proteína (PRF) e os concentrados proteicos 1 e 2 (CPC1 e CPC2). A fração PRF foi obtida por um processo de peneiramento e os concentrados CPC1 e CPC2 foram extraídos por diferentes métodos utilizando o processo de *pH-shifting*. As proteínas concentradas CPC2 apresentaram maior rendimento, seguido do concentrado CPC1 e fração PRF. Esses produtos apresentaram diferenças nos teores de proteínas, aminoácidos e estrutura. As propriedades funcionais avaliadas também apresentaram diferenças: os concentrados CPC1 e CPC2 exibiram menores valores de solubilidade, capacidade de absorção de água, capacidade de formação de emulsão e de espuma comparados com o subproduto CF e fração PRF. Foram utilizadas enzimas comerciais para hidrolisar CF, PRF, CPC1 e CPC2, como a Alcalase (A), Flavourzyme (F) e sistema sequencial Alcalase-Flavourzyme (S). O maior valor de grau de hidrólise foi obtido com o sistema sequencial, onde ambos os concentrados CPC1 e CPC2 foram mais suscetíveis ao ataque das enzimas. Os hidrolisados foram ultrafiltrados em membrana de 10 e 3 kDa e as frações peptídicas maiores de 10 kDa, entre 3 e 10 kDa e menores de 3 kDa, denominadas F1, F2 e F3 respectivamente, foram produzidas. Para os hidrolisados do subproduto CF e da fração PRF, as frações de peptídeos entre 3 e 10 kDa mostram melhores propriedades antioxidantes, enquanto que para os concentrados CPC1 e CPC2, as frações de peptídeos menores de 3 kDa mostram melhores propriedades antioxidantes. Os hidrolisados com o sistema enzimático Flavourzyme foram mais efetivos como antioxidantes, seguido pela Alcalase. Então, foram selecionadas oito frações peptídicas para avaliar o efeito dos peptídeos na oxidação lipídica da carne, os sistemas enzimáticos sequencial (CPC2-S F2 500 $\mu\text{g g}^{-1}$, CF-S F3 250 e 500 $\mu\text{g g}^{-1}$) e Alcalase (PRF-A F3 250 e 500 $\mu\text{g g}^{-1}$) foram mais efetivos, indicando o potencial para o uso desses peptídeos em produtos alimentícios com propriedades antioxidantes. Além disso, um teste *in vivo* utilizando a *Saccharomyces cerevisiae* e o peróxido de hidrogênio como um agente estressor foi realizado, comprovando que quatro dos produtos estudados (CF-S F3, CPC2-F F2, CPC1-A F2 e CPC1-F F2) aumentaram significativamente ($p < 0,05$) a sobrevivência da levedura, quando exposta a um agente estressor. A atividade antibacteriana dos hidrolisados foi avaliada, demonstrando inibição para as bactérias Gram positivas e melhor resposta com os sistemas enzimáticos Flavourzyme e Sequencial, além de atividade bactericida, apresentada pela fração PRF e pelo concentrado CPC2. Todos os peptídeos de chia apresentaram atividade hipocolesterolêmica, sendo que o subproduto CF-S F3 apresentou resultado semelhante à pravastatina (controle). Em conclusão, os hidrolisados proteicos provenientes do subproduto da obtenção de óleo de chia apresentam potencial para serem utilizados como ingredientes funcionais a serem incluídos em alimentos, com atividade antioxidante, antibacteriana e hipocolesterolêmica.

Palavras-chave: Antioxidante. Antibacteriana. Farinha de chia. Funcionalidade. Hipocolesterolêmica. Peptídeos bioativos.

ABSTRACT

Evaluation of bioactivity of hydrolysates and peptides fractions of proteins from the by-product of oil processing of chia (*Salvia hispanica* L)

The industrial production of chia oil is carried out by cold extraction of the seed. This process generates residues, by-product, currently used in the manufacture of defatted chia flour and animal feed, being low-cost products. The aim of this study was to hydrolyze proteins from the chia oil by-product and to obtain peptides with antioxidant, antibacterial and hypocholesterolemic properties. The partially defatted chia flour (by-product - CF) was obtained from a company in Estância Velha, RS. From this product were obtained: the protein rich fraction (PRF) and the protein concentrates 1 and 2 (CPC1 and CPC2). The PRF fraction was obtained by a sieving process, while CPC1 and CPC2 concentrates were extracted by different methods using the pH-shifting process. Protein concentrate CPC2 presented higher yield, followed by CPC1 concentrate and PRF fraction. These products showed differences in protein, and amino acid contents and also in structure. The functional properties evaluated showed differences: the CPC1 and CPC2 concentrates exhibited lower solubility, water absorption capacity, emulsion and foam capacity formation compared to the CF by-product and PRF fraction. Commercial enzymes were used to hydrolyze CF, PRF, CPC1 and CPC2, such as Alcalase (A), Flavourzyme (F) and Alcalase-Flavourzyme (S) sequential system. The highest value of hydrolysis degree was obtained with the sequential system, where both CPC1 and CPC2 concentrates were more susceptible to the attack of such enzymes. The hydrolysates were ultrafiltered in 10 and 3 kDa membranes and the peptide fractions greater than 10 kDa, between 3 and 10 kDa and smaller than 3 kDa, designated F1, F2 and F3 respectively, were produced. For hydrolysates of CF by-product and PRF fraction, peptide fractions between 3 and 10 kDa showed better antioxidant properties, whereas for CPC1 and CPC2 concentrates, fractions of peptides smaller than 3 kDa showed better antioxidant properties. The hydrolysates with the enzymatic system Flavourzyme were more effective as antioxidants, followed by Alcalase. In order to evaluate the effect of the peptide fraction on the lipid oxidation of the meat, the sequential enzymatic systems (CPC2-S F2 500 $\mu\text{g g}^{-1}$, CF-S F3 250 and 500 $\mu\text{g g}^{-1}$) and Alcalase (PRF-A F3 250 and 500 $\mu\text{g g}^{-1}$) were more effective, indicating the potential use of these peptides in food products with antioxidant properties. In addition, an *in vivo* test using *Saccharomyces cerevisiae* and hydrogen peroxide as a stressor was performed, proving that four of the studied products (CF-S F3, CPC2-F F2, CPC1-A F2 and CPC1-F F2) significantly increased ($p < 0.05$) the survival of yeast, when exposed to a stressor. The antibacterial activity of the hydrolysates was evaluated, demonstrating inhibition for Gram positive bacteria and better response with Flavourzyme and sequential enzyme systems, besides bacterial activity, presented in the PRF fraction and CPC2 concentrate. All chia peptides had hypocholesterolemic activity, and the by-product CF-S F3 presented a similar result to pravastatin (control). In conclusion, protein hydrolyzates from the by-product of chia oil has potential for use as functional ingredients to be included in foods with antioxidant, antibacterial and hypocholesterolemic activity.

Keywords: Antioxidant. Antibacterial. Chia flour. Functionality. Hypocholesterolemic. Bioactive peptides.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Condições de hidrólise utilizadas para a preparação de hidrolisados de proteína de chia	77
Tabela 2 - Propriedades físico-químicas do subproduto, farinha de chia (CF), da fração rica em proteína (PRF) e dos concentrados proteicos (CPC1 e CPC2).....	88
Tabela 3 - Composição de aminoácidos do subproduto, farinha de chia (CF), fração rica em proteína (PRF), concentrado proteico 1 (CPC1) e concentrado proteico 2 (CPC2).....	90
Tabela 4 - Características térmicas, formação de gel e capacidade de absorção de óleo do subproduto farinha de chia (CF), da fração rica em proteína (PRF), do concentrado proteico 1 (CPC1) e do concentrado proteico 2 (CPC2)	96
Tabela 5 - Grau de hidrólise (GH) por três sistemas enzimáticos e rendimento (%) dos hidrolisados proteicos do subproduto farinha (CF), fração rica em proteína (PRF), concentrado proteico 1 (CPC1) e concentrado proteico 2 (CPC2) de chia, resultantes da ultrafiltração ...	105
Tabela 6 - EC50 para DPPH de hidrolisados e frações peptídicas do subproduto farinha (CF), fração rica em proteína (PRF), concentrado proteico 1 (CPC1) e concentrado proteico 2 (CPC2) de chia.....	107
Tabela 7 - Atividade antioxidante por captura do radical livre ABTS ⁺ de hidrolisados e frações peptídicas do subproduto farinha (CF), fração rica em proteína (PRF), concentrado proteico 1 (CPC1) e concentrado proteico 2 (CPC2) de chia	109
Tabela 8 - Atividade antioxidante por FRAP de hidrolisados e frações peptídicas do subproduto farinha (CF), fração rica em proteína (PRF), concentrado proteico 1 (CPC1) e concentrado proteico 2 (CPC2) de chia	111
Tabela 9 - Inibição da oxidação lipídica da carne pelas frações peptídicas do subproduto farinha (CF), fração rica em proteína (PRF), concentrado proteico 1 (CPC1) e concentrado proteico 2 (CPC2) de chia durante 6 dias de armazenamento a 4 °C	114
Tabela 10 - Atividade antibacteriana de hidrolisados de proteína de chia obtidos por três sistemas enzimáticos	118
Tabela 11 - Valores de concentração mínima inibitória (CMI) e bactericida (CMB) de hidrolisados antibacterianos de proteína de chia	119
Tabela 12 - Inibição percentual da enzima HMG-CoA redutase na presença de proteína de chia hidrolisada filtrada através de uma membrana de corte de 3 KDa	122

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Sementes de chia.....	29
Figura 2 - Curva típica de uma análise térmica diferencial (DSC), (a) variação da capacidade calorífica ou T_g , (b) processo endotérmico, (c) processo exotérmico	37
Figura 3 - Principais bandas de absorção em FTIR e a sua localização no espectro eletromagnético	37
Figura 4 - Representação esquemática de uma medida por espectroscopia por transformada de Fourier de absorção no infravermelho	38
Figura 5 - Esquema representativo da técnica de eletroforese SDS-PAGE	39
Figura 6 - Produção de hidrolisados proteicos antes (etapa 1: as enzimas estão no estado ativo) e após a (etapa 2: desativação de enzimas após hidrólise completa) hidrólise enzimática	47
Figura 7 - Classificação das enzimas de acordo com a sua atividade catalítica.....	49
Figura 8 - Reação entre o radical DPPH (violeta) e um antioxidante que produz a molécula de DPPH neutralizada (laranja). Os espectros UV/VIS correspondentes também são apresentados. Uma diminuição significativa da absorbância a 517 nm aparece durante a reação e pode ser usada para seguir a reação	52
Figura 9 - Estabilização do radical $ABTS^+$ por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio	53
Figura 10 - Reação química que descreve a produção de Fe^{2+} (forma ferrosa) a partir da redução de Fe^{3+} (forma férrica) presente no complexo com TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina).....	54
Figura 11 - Apresentação das diferenças entre as paredes celulares de bactérias Gram positivas e Gram negativas	62
Figura 12 - Representação da biossíntese de colesterol	66
Figura 13 - Fluxograma do desenvolvimento do projeto de tese	69
Figura 14 - Fluxograma do processo de obtenção dos concentrados proteicos de chia	71
Figura 15 - Fotografias do subproduto (CF), fração rica em proteína (PRF), concentrado proteico 1 (CPC1) e concentrado proteico 2 (CPC2) utilizados neste estudo	89
Figura 16 - Espectro FTIR de CF (farinha de chia parcialmente desengordurada- subproduto), PRF (fração rica em proteína), CPC1 (concentrado proteico 1) e CPC2 (concentrado proteico 2).....	92
Figura 17 - Perfil eletroforético do subproduto farinha (CF), da fração rica em proteína (PRF), do concentrado proteico (CPC1) e do concentrado proteico 2 (CPC2) de chia	93

Figura 18 - Micrografias utilizando um microscópio eletrônico de varredura do subproduto CF (farinha de chia), fração PRF (fração rica em proteína), concentrado CPC1 (concentrado proteico de chia 1) e concentrado CPC2 (concentrado proteico de chia 2)	94
Figura 19 - Fotografias dos concentrados proteicos (A) CPC1 e (B) CPC2, esquerda (precipitados proteicos) e direita (concentrados proteicos úmidos).....	95
Figura 20 - Solubilidade proteica (A) e capacidade de absorção de água (B) do subproduto farinha (CF), fração rica em proteína (PRF), concentrado proteico 1 (CPC1) e concentrado proteico 2 (CPC2) de chia.....	99
Figura 21 - Capacidade (A) e estabilidade (B) emulsificante do subproduto farinha (CF), fração rica em proteína (PRF), concentrado proteico 1 (CPC1) e concentrado proteico 2 (CPC2) de chia	101
Figura 22 - Capacidade (A) e estabilidade (B) de formação de espuma do subproduto farinha (CF), fração rica em proteína (PRF), concentrado proteico 1 (CPC1) e concentrado proteico 2 (CPC2) de chia	103
Figura 23 - Fotografias dos hidrolisados proteicos obtidos a partir do subproduto farinha (CF), fração rica em proteína (PRF), concentrado proteico 1 (CPC1) e concentrado proteico 2 (CPC2) de chia	104
Figura 24 - Taxas de sobrevivência de <i>S. cerevisiae</i> tratadas com frações peptídicas de chia em presença e ausência de agente estressor (H ₂ O ₂).....	116

ABREVIATURAS

ΔH – diferença de entalpia

A – hidrolisado proteico utilizando a Alcalase

AE – atividade emulsificante

ABTS⁺ – sequestro do radical 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico

BHA – butil hidroxianisol

BHT – butil hidrotolueno

CAO – capacidade de absorção de óleo

CTA1 – Gene da Catalase A

CTT1 – Gene da Catalase T

CF – farinha de chia parcialmente desengordurada (subproduto)

CMB – concentração mínima bactericida

CMI – concentração mínima inibitória

CPC1 – concentrado proteico de chia 1

CPC2 – concentrado proteico de chia 2

CuZn-SOD – produto do gene *SOD1*

DPPH – sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila

DSC – calorimetria diferencial de varredura

ECA – enzima conversora da Angiotensina I

EE – estabilidade emulsificante

F – hidrolisado proteico utilizando a Flavourzyme

F1 – representa as frações peptídicas de tamanho molecular > 10 kDa

F2 – representa as frações peptídicas de tamanho molecular 3-10 kDa

F3 – representa as frações peptídicas de tamanho molecular < 3 kDa

Fe²⁺ – forma ferrosa

Fe³⁺ – forma férrica

FRAP – capacidade de redução do íon Ferro

FTIR – espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

GH – grau de hidrólise

GPx – Glutathione peroxidase

GSH - Glutathione reduzida

GSSG – Glutathione dissulfeto

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

HMG-CoA redutase – 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase
HMG-CoA – 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A
IB – índice de brancura
LCE – least concentration endpoint (menor concentração de gelificação)
LDL – lipoproteína de baixa densidade
LGC – menor concentração de gelificação
LPS – lipopolissacarídeos
MDA – malonaldeído
MEV – microscopia eletrônica de varredura
Mn-SOD – produto do gene *SOD2*
MM – massa molecular
NH₂ – grupamento amino
O₂⁻ – ânion superóxido
OH⁻ – radical hidroxila
OMS – Organização Mundial da Saúde
Ômega-3 – ácido α -linolênico
ORAC – sequestro do radical peroxil
PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida
PG – galato de propila
PI – ponto isoelétrico
PRF – fração rica em proteína
S – hidrolisado proteico utilizando o sistema seqüencial Alcalase-Flavourzyme
SDS – dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
SOD - superóxido dismutase
TBARS – inibição da formação de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico;
TBHQ – t-butil hidroquinona
T_d – temperatura de desnaturação
TPTZ – 2,4,6- tripiridil-s-triazina
Trolox – 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid
UFC – unidades formadoras de colônia
WHT – World Heart Federation
YPD – meio completo para crescimento de levedura

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	OBJETIVOS	27
2.1	GERAL	27
2.2	ESPECÍFICOS	27
3	REVISÃO DA LITERATURA	29
3.1	PESQUISAS SOBRE A SEMENTE DE CHIA	29
3.2	SUBPRODUTO DA PRODUÇÃO DE ÓLEO DE CHIA	32
3.3	PROTEÍNAS DE CHIA	33
3.4	MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS	34
3.5	ANÁLISES DE CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS	36
3.5.1.	Calorimetria diferencial de varredura	36
3.5.2.	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier	37
3.5.3.	Microscopia eletrônica de varredura	38
3.5.4.	Análise eletroforética	39
3.6	PROPRIEDADES FUNCIONAIS DAS PROTEÍNAS	40
3.6.1.	Solubilidade	41
3.6.2.	Capacidade de absorção de água e óleo	43
3.6.3.	Propriedade emulsificante	44
3.6.4.	Propriedade espumante	44
3.6.5.	Propriedade gelificante	45
3.7	HIDRÓLISE PROTEICA	46
3.8	ENZIMAS PROTEOLÍTICAS	49
3.9	PROPRIEDADES BIOATIVAS DOS HIDROLISADOS PROTEICOS	50
3.9.1.	Atividade antioxidante	50
3.9.1.1	Métodos <i>in vitro</i> da determinação da atividade antioxidante	51
i.	Capacidade de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH)	52
ii.	Captura do radical 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS ⁺)	53
iii.	Capacidade de redução do íon Ferro (FRAP)	53
3.9.1.2	Aplicação dos peptídeos em alimento para verificar atividade antioxidante	54
3.9.1.3	Modelo biológico para avaliação da capacidade antioxidante	57
3.9.2.	Atividade antibacteriana	60
3.9.2.1.	Métodos de análise de atividade antibacteriana	63
i.	Disco difusão	63
ii.	Concentração mínima inibitória	64
iii.	Concentração mínima bactericida	64
3.9.3.	Atividade hipocolesterolêmica	65
4	MATERIAL E MÉTODOS	69
4.1.	DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO	69
4.2.	MATÉRIA-PRIMA	69
4.3.	ENZIMAS	70
4.4.	MICRO-ORGANISMOS E LEVEDURA	70

4.5. MÉTODOS.....	70
4.5.1 Determinação da atividade específica das enzimas	70
4.5.2 Obtenção da fração rica em proteína	70
4.5.3 Obtenção dos concentrados proteicos.....	71
4.5.4 Caracterização da farinha parcialmente desengordurada, da fração rica em proteína e dos concentrados proteicos.....	71
4.5.4.1 Composição proximal.....	72
4.5.4.2 Cor	72
4.5.4.3 Composição de aminoácidos	72
4.5.4.4 Fracionamento das proteínas	72
4.5.4.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida	73
4.5.4.6 Calorimetria diferencial de varredura.....	73
4.5.4.7 Espectroscopia de infravermelho	74
4.5.4.8 Microscopia eletrônica de varredura	74
4.5.5 Propriedades funcionais da farinha parcialmente desengordurada, da fração rica em proteína e dos concentrados proteicos.....	74
4.5.5.1 Menor concentração de gelificação	74
4.5.5.2 Firmeza do gel	74
4.5.5.3 Solubilidade proteica	75
4.5.5.4 Capacidade e estabilidade de espuma.....	75
4.5.5.5 Atividade e estabilidade emulsificante	76
4.5.5.6 Capacidade de absorção de água e óleo.....	76
4.5.6 Hidrólise proteica	77
4.5.7 Fracionamento dos peptídeos utilizando ultrafiltração	78
4.5.8 Avaliação da bioatividade dos hidrolisados e frações peptídicas	78
4.5.8.1. Atividade antioxidante <i>in vitro</i>	79
i. Capacidade de sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picrilidrazil	79
ii. Capacidade de sequestro do radical 2,2-azinobis (3- etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)	79
iii. Capacidade de redução do ferro	80
4.5.8.2. Determinação do efeito das frações peptídicas selecionadas na oxidação lipídica da carne.....	80
4.5.8.3. Atividade antioxidante <i>in vivo</i>	81
4.5.8.4. Atividade antibacteriana	82
i. Reativação dos micro-organismos	82
ii. Disco difusão	83
iii. Concentração mínima inibitória	83
iv. Concentração mínima bactericida	84
4.5.8.5. Atividade hipocolesterolêmica <i>in vitro</i>	84
4.5.9 Análise estatística.....	85
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	87
5.1. INFLUÊNCIA DO PROCESSO DE ISOLAMENTO DAS PROTEÍNAS DE CHIA NAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS	87
5.2. INFLUÊNCIA DO PROCESSO DE ISOLAMENTO DAS PROTEÍNAS NA ESTRUTURA PROTEICA.....	92
5.3. INFLUÊNCIA DO PROCESSO DE ISOLAMENTO DAS PROTEÍNAS NAS PROPRIEDADES FUNCIONAIS.....	95
5.4. HIDRÓLISE PROTEICA PARA A OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS.....	104

5.5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i> DOS PEPTÍDEOS DE CHIA	106
5.6. EFEITOS DOS PEPTÍDEOS SELECIONADOS NA OXIDAÇÃO LIPÍDICA DA CARNE	113
5.7. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VIVO</i> DOS PEPTÍDEOS SELECIONADOS	115
5.8. ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS HIDROLISADOS PROTEICOS DE CHIA	118
5.9. ATIVIDADE HIPOCOLESTEROLÊMICA <i>IN VITRO</i> DAS FRAÇÕES PEPTÍDICAS DE CHIA	121
6 CONCLUSÃO	125
6.1. CONCLUSÕES PARCIAIS	125
6.2. CONCLUSÃO GERAL.....	126
7 SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS.....	127
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	129
APÊNDICES	155

1 INTRODUÇÃO

As sementes de chia (*Salvia hispanica* L.) têm se tornado importantes para a saúde e nutrição humana, devido a sua alta porcentagem de ácido α -linolênico, maior do que qualquer outra fonte vegetal, e aos efeitos benéficos para a saúde decorrentes de seu consumo (AYERZA; COATES, 2011). Entretanto, no Brasil, existem poucas indústrias de processamento de chia. A produção industrial de óleo de chia é realizada por extração a frio da semente. Este processo gera resíduos, atualmente utilizados na fabricação de farinha de chia desengordurada e na ração para animais, sendo esses produtos de baixo custo. O processamento gera grandes quantidades de resíduos e subprodutos, entre 20 e 60% m/m (AWARENET, 2004). Entretanto, a quantidade de subprodutos do processamento de óleo de chia proveniente da indústria é desconhecida.

A farinha de sementes de chia pode ser uma valiosa fonte de proteína, fibras insolúveis e compostos antioxidantes, uma vez que está constituída por 25-40% de lipídios, 18-33% de fibras, 17-24% de proteína e 5-9% de mucilagem (COELHO; SALAS-MELLADO, 2014; SANDOVAL-OLIVEROS; PAREDES-LÓPEZ, 2013; TIMILSENA et al., 2016a). A produção mundial de sementes de chia é de cerca de 30.000 toneladas por ano (DANIELLS, 2013). A utilização do subproduto da produção do óleo de chia, como a farinha parcialmente desengordurada, é uma estratégia utilizada para adicionar valor a esse subproduto. Esse pode ser utilizado como matéria-prima para a extração das proteínas. Há um crescente interesse na indústria para encontrar proteínas de fontes alternativas com bons atributos funcionais. Como denominação geral, em base seca, a fração rica em proteína, os concentrados proteicos e os isolados proteicos contêm menos que 65%, entre 65 e 90%, e acima de 90% de proteína, respectivamente (BOYE et al., 2010).

As proteínas de chia possuem importância nutricional e, além disso, têm sido largamente estudadas (SANDOVAL-OLIVEROS; PAREDES-LÓPEZ, 2013; SEGURA-CAMPOS et al., 2013; OLIVOS-LUGO et al., 2010; VÁZQUEZ-OVANDO et al., 2010). Entretanto, as características das proteínas da semente de chia ainda não são bem esclarecidas. Os processos de extração térmica, físico-química, os atributos nutricionais e algumas propriedades funcionais como a formação de espuma, capacidades de absorção de água e de óleo de sementes de chia foram relatadas em diversos estudos (BUSHWAY et al., 1984; OLIVOS-LUGO et al., 2010; VÁZQUEZ-OVANDO; BETANCUR-ANCONA; CHEL-GUERRERO, 2013; MONROY-TORRES et al., 2008; SANDOVAL-OLIVEROS; PAREDES-LÓPEZ, 2013). Apesar da popularidade das sementes de chia inteiras ou intactas em formulações alimentícias incluindo produtos de panificação e barras de cereais, a sua proteína ainda não é utilizada industrialmente

em alimentos. Isto deve-se à falta de informação sobre as composição estrutural e funcional destas. O aumento do conhecimento dessas características aumentará significativamente sua aplicação industrial. Portanto, a relação da qualidade da proteína com parâmetros de processamento, que afetam o desempenho funcional de produtos proteicos, é merecedor de extensa investigação.

Os peptídeos bioativos podem desempenhar papel importante na regulação metabólica, sugerindo seu uso potencial como nutracêuticos e ingredientes funcionais para promover a saúde e reduzir o risco de doenças (GAGNAIRE et al., 2011). Os peptídeos com atividades antioxidantes são capazes de inativar espécies reativas de oxigênio, eliminar os radicais livres, quelar metais, reduzir hidroperóxidos e eliminar oxidantes específicos dos alimentos, sendo utilizados como antioxidantes potencialmente multifuncionais, conferindo um aumento do valor nutricional das dietas. Os fatores como a fonte de proteína, tipo de enzima proteolítica e do processo da hidrólise são determinantes na composição e sequência aminoacídica e consequentemente no potencial atividade antioxidante (BAMDAD; WU; CHEN, 2011).

Pesquisas demonstraram o potencial antioxidante da fração fibrosa (CAPITANI et al., 2012; VÁZQUEZ-OVANDO; BETANCUR-ANCONA; CHEL-GUERRERO, 2013) e da semente (MARINELI et al., 2014; COELHO; SALAS-MELLADO, 2014) de chia. A atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos obtidos pela digestão das frações de proteínas (albuminas, prolaminas, globulinas e glutelinas) (ORONA-TAMAYO et al., 2015) e da fração rica em proteína, utilizando um sistema sequencial Alcalase-Flavourzyme, (SEGURA-CAMPOS et al., 2013) de chia também foram relatadas. Além disso, também existem estudos sobre a atividade inibitória da enzima conversora da Angiotensina I (ECA) (SEGURA-CAMPOS et al., 2013; SALAZAR-VEGA et al., 2010; ORONA-TAMAYO et al., 2015). Contudo, as proteínas de chia, em estudos anteriores, não apresentaram atividade antimicrobiana frente as bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Salmonella typhi* e *Shigella flexneri*) e Gram-positivas (*Klebsiella pneumonia*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Streptococcus agalactae*) (SEGURA-CAMPOS et al., 2013). Além disso, até o momento, não existem estudos sobre a atividade antioxidante utilizando uma protease microbiana comercial, isoladamente, para gerar hidrolisados/peptídeos antioxidantes à base de proteínas de chia como estratégia prática para melhorar a qualidade dos alimentos e prolongar a vida útil inibindo a oxidação de lipídios. E, também não há estudos em relação ao potencial antioxidante *in vivo* sob condições de estresse oxidativo.

Ivanov et al. (1997) foram uns dos primeiros pesquisadores a sugerir que as proteínas poderiam atuar na homeostase, agindo em tecidos específicos. O potencial hipocolesterolêmico

de algumas leguminosas já é conhecido. Algumas proteínas vegetais já apresentaram efeito hipocolesterolêmico: soja (PAK et al., 2005; ZHONG et al., 2007), arroz (CABANOS et al., 2013; WAKASA et al., 2011), feijão (MARQUES et al., 2015b) e amaranto (SOARES et al., 2015). O consumo da proteína de soja é capaz de reduzir o colesterol sanguíneo, provavelmente por ação dos peptídeos, liberados após digestão enzimática *in vitro* ou *in vivo* da proteína (POTTER, 1998; PAK et al., 2005). Entretanto, a atividade hipocolesterolêmica ainda não foi relatada para as proteínas de chia.

Os peptídeos bioativos que apresentam efeitos antibacterianos possuem aplicações potenciais na qualidade e segurança dos alimentos e na saúde humana. A segurança e a vida útil dos alimentos são uma preocupação significativa na indústria de alimentos. Estes são afetados pela incidência de bactérias patogênicas e deteriorantes que podem contaminar alimentos através de várias rotas. Um amplo espectro de métodos foi empregado para evitar o crescimento dessas bactérias nos alimentos, incluindo o uso de agentes antibacterianos sintéticos e naturais. No entanto, o uso de agentes sintéticos é preocupante, devido ao possível impacto negativo desses agentes ao meio ambiente e a saúde humana, como por exemplo: surgimento de cepas multirresistentes, potencial alergênico e carcinogênico (nitritos) de conservação, entre outros. Assim, novos agentes antibacterianos de fontes naturais são altamente necessários (OSMAN et al., 2016). O uso de frações peptídicas restringe a sua potencial atividade antibacteriana porque os peptídeos com alta atividade antibacteriana, tais como: defensinas (29-42 aminoácidos), catelicidinas (12-80 aminoácidos) e histatinas (24-38 resíduos de aminoácidos) são polipeptídeos contendo um elevado número de aminoácidos (RIVERA; RAMOS; DESGARENNES, 2007).

Durante as duas últimas décadas, vários peptídeos com atividade antibacteriana frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas foram isolados e identificados a partir de hidrolisados de proteínas (ABDEL-HAMID et al., 2016; HWANG et al., 2016). Segura-Campos et al. (2013) verificaram que os hidrolisados de proteína de chia, na concentração de 50 mg de proteína mL⁻¹ não apresentaram atividade antibacteriana. Com base em nosso conhecimento, existe uma falta de informação sobre os efeitos das condições de hidrólise sobre a bioatividade da proteína de chia. A partir deste contexto, neste estudo, foram obtidos hidrolisados proteicos do subproduto da produção do óleo de chia e de três métodos de obtenção de proteínas de chia, utilizando duas enzimas, e, suas bioatividades, estudadas: atividade antioxidante, antibacteriana e hipocolesterolêmica.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Obter peptídeos, a partir da hidrólise enzimática das proteínas de chia (*Salvia hispanica* L.), extraídas por diferentes métodos e determinar sua bioatividade.

2.2 ESPECÍFICOS

- Obter a fração rica em proteína e os concentrados proteicos do subproduto da produção do óleo de chia - farinha de chia parcialmente desengordurada;
- Caracterizar o subproduto, os concentrados proteicos e a fração rica em proteína;
- Obter os hidrolisados do subproduto, da fração rica em proteína e dos concentrados proteicos, utilizando as enzimas Alcalase, Flavourzyme e sequencial Alcalase-Flavourzyme;
- Fracionar os hidrolisados em peptídeos mediante ultrafiltração;
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* dos hidrolisados e das frações peptídicas;
- Avaliar o efeito, do melhor resultado obtido *in vitro*, na oxidação lipídica da carne e em células de *Saccharomyces cerevisiae* submetidas ao estresse oxidativo induzido pelo peróxido de hidrogênio;
- Avaliar a atividade antibacteriana dos hidrolisados proteicos;
- Avaliar a atividade hipocolesterolêmica *in vitro* das frações peptídicas.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 PESQUISAS SOBRE A SEMENTE DE CHIA

As sementes de chia (Figura 1) têm um papel muito importante como alimento funcional e suplemento alimentar (COELHO; SALAS-MELLADO, 2014). A composição e a concentração dos seus compostos bioativos dependem de vários fatores: condições climáticas, origem geográfica e métodos de extração (AYERZA; COATES, 2004, 2009a, 2009b, 2011; CAPITANI et al., 2012; IXTAINA et al., 2011). As sementes são compostas por fibra dietética total de 47,1 a 59,8% (WEBER et al., 1991) e contêm até 40% de lipídios com alto teor de ácidos graxos insaturados, dos quais o ácido α -linolênico representa até 68% (AYERZA, 1995; TAGA; MILLER; PRATT, 1984). Além disso, elas são uma boa fonte de proteínas (19,0-26,5%), vitaminas, minerais e antioxidantes (BUSHWAY; BELYEA; BUSHWAY, 1981). Estes dados chamam a atenção dos pesquisadores porque, nos últimos anos, houve um interesse crescente em todos estes compostos (AYERZA; COATES, 2004, 2011; CAPITANI et al., 2012). Além disso, as sementes de chia não contêm compostos tóxicos e glúten, tornando as sementes seguras também como ingrediente para dietas sem glúten (MENGA et al., 2017).

Figura 1 - Sementes de chia



Fonte: RUBIO et al. (2012)

Ainda assim, poucos estudos se têm até hoje sobre as proteínas de chia. Uma pesquisa foi realizada utilizando a base de dados Web of Knowledge (v.4.10 — Web of Science) de Thomson Reuters Inc. (disponível em www.isiknowledge.com), em Outubro de 2017, utilizando as palavras-chaves “chia” and “protein” no título. Trinta artigos foram encontrados, sendo somente dezoito artigos sobre a semente. O Quadro 1 apresenta os estudos que têm sido realizados.

Quadro 1 – Estudos sobre proteínas de chia de 1981-2017

Objetivo do estudo	Revista	Fator de impacto¹	Referência
Estudar o comportamento de liberação e digestão das microcápsulas de óleo de chia com a proteína e mucilagem de chia como material de parede	Food Hydrocolloids	4,747	Timilsena et al. (2017)
Utilizar a mucilagem e a proteína solúvel extraída da semente de chia e da linhaça utilizadas como material de encapsulação para duas bactérias probióticas	Food Chemistry	4,529	Bustamante et al. (2017)
Avaliar o efeito dos métodos de secagem sobre as características físico-químicas e funcionais do isolado proteico de chia	Food Chemistry	4,529	Timilsena et al. (2016a)
Produzir microcápsulas de óleo de chia utilizando a proteína e mucilagem de chia como material de parede	Food Hydrocolloids	4,747	Timilsena et al. (2016b)
Avaliar a qualidade proteica da chia não tratada e tratada termicamente (90 °C/20min) em ratos Wistar	Plant Foods for Human Nutrition	2,722	Da Silva et al. (2016)
Estudar a coacervação complexa entre o isolado proteico de chia e a goma de chia	Food Hydrocolloids	4,747	Timilsena et al. (2016c)
Identificar as frações de proteína de chia e determinar seu potencial anti-hipertensivo e sua capacidade antioxidante e de quelação de íons	LWT-Food Science and Technology	2,329	Orona-Tamayo et al. (2015)
Estudar a atividade de inibição da ACE, antioxidante e antimicrobiana em hidrolisado da fração rica em proteínas de chia	LWT-Food Science and Technology	2,329	Segura-Campos et al. (2013)
Avaliar as propriedades físico-químicas e funcionais para a fração rica em proteínas de chia produzida por fracionamento à seco	CYTA-Journal of Food	1,180	Vázquez-Ovando; Betancur-Ancona; Chel-Guerrero (2013)
Caracterizar as proteínas de armazenamento de chia	Journal of Agricultural and Food Chemistry	3,154	Sandoval-Oliveros; Paredes-López (2013)

Cont. **Quadro 1** – Estudos sobre proteínas de chia de 1981-2017

Objetivo do estudo	Revista	Fator de impacto¹	Referência
Avaliar os efeitos da proteína de chia na redução de triglicerídeos séricos e intolerância à glicose em pacientes com síndrome metabólica	Journal of Nutrition	4,145	Guevara-Cruz et al. (2012)
Avaliar os teores de proteína e lipídios da chia e sua relação com a localização	Industrial Crops and Products	3,181	Ayerza; Coates (2011)
Estudar as propriedades térmicas, funcionais e nutricionais das principais frações de proteínas obtidas a partir de isolado proteico de chia	Food Science and Technology International	0,954	Olivos-Lugo; Valdivia-Lopez; Tecante (2010)
Caracterizar as frações ricas em proteínas e fibras extraídas da farinha de chia desengordurada	CYTA-Journal of Food	1,180	Vázquez-Ovando et al. (2010)
Determinar o efeito de localização no ciclo de crescimento, teor de proteína, de lipídios e perfis de ácidos graxos de um único genótipo de sementes de chia	Journal of Oleo Science	1,076	Ayerza (2009)
Avaliar o desempenho e qualidade da semente de chia de três seleções plantadas em diferentes altitudes no Equador	Industrial Crops and Products	3,181	Ayerza; Coates (2009a)
Caracterizar as frações proteicas e de lipídios da chia.	Journal of Food Science	1,815	Bushway et al. (1984)
Estudar a chia como possível fonte de proteína para a indústria de alimentos.	Journal of Food Science	1,815	Bushway; Belyea; Bushway (1981)

¹Fator de impacto das revistas em 2016.

A maior parte dos artigos publicados sobre as proteínas de chia são em revistas de alto fator de impacto na área de alimentos, o que evidencia a importância desse estudo para a utilização deste ingrediente na indústria de alimentos. Além disso, dos trinta artigos, apenas dois são de hidrolisados proteicos de chia, o que evidencia a importância e o diferencial deste estudo. Atualmente, De Falco; Amato; Lanzotti (2017) resumiram os conhecimentos atuais sobre as propriedades fitoquímicas e farmacológicas das sementes de chia com ênfase especial na nutrição e concluiu que ainda há necessidade de estudos adicionais.

3.2 SUBPRODUTO DA PRODUÇÃO DE ÓLEO DE CHIA

As sementes de chia são consideradas um pseudocereal e, devido ao seu alto teor de óleo, também são consideradas oleaginosas. A chia é recomendada para uso devido à sua alta porcentagem de ácidos graxos que são benéficos para a saúde, proteínas, antioxidantes e fibras (OLIVOS-LUGO; VALDÍVIA-LOPES; TECANTE, 2010; VÁZQUEZ-OVANDO et al., 2010; IXTAINA et al., 2011; MARTÍNEZ et al., 2012; MARINELI et al., 2014). Os ácidos graxos poliinsaturados não podem ser produzidos pelo corpo humano e devem ser obtidos pela dieta (LUNA PIZARRO et al., 2013).

Após a extração do óleo das sementes de chia é obtido o subproduto com uma quantidade significativa de fibras, proteínas e outros compostos flavonóides, tais como a miricetina, a quercetina, o kaempferol e alguns ácidos cinâmicos, como o caféico e o clorogênico, que demonstraram atividade antioxidante (TAGA; MILLER; PRATT, 1984). Além disso, apresentam um polissacarídeo denominado ácido urônico, com uma estrutura química moldada de uma cadeia principal de unidades de β -D-xilopiranosil e grupos α -D-glucopiranosilo com ramificações de ácido 4-O-metil- α -D-glicuronopiranosil (LIN; DANIEL; WHISTLER, 1994), que se comporta como uma mucilagem com alta capacidade de absorção de água.

O resíduo de chia (remanescente após a extração de óleo) é uma boa fonte de proteínas (19,0-23,0%), fibra dietética (33,9-39,9%) e compostos com atividade antioxidante (MARINELI et al., 2014). Também exibe propriedades funcionais interessantes que seriam benéficas para a sua utilização na indústria de alimentos. As propriedades funcionais são geralmente associadas à presença de proteínas e de fibra dietética (REYES-CAUDILLO; TECANTE; VALDIVIA-LÓPEZ, 2008; CAPITANI et al., 2012).

Os alimentos que contêm alto teor de gordura devem ser desengordurados anteriormente ao processo de isolamento e consequente hidrólise, para evitar a formação de emulsão durante

o processo de extração da proteína (ABBOTT et al., 1991; SATHE et al., 2002). A remoção de lipídios livres ou fracamente ligados à proteína provoca pequenos aumentos na quantidade de proteína que pode ser solubilizada (BACCHI; BATISTUTI, 1994). Outra vantagem do desengorduramento consiste na remoção de certos compostos indesejáveis, geralmente presentes nas sementes, tais como oligossacarídeos e compostos de baixa massa molecular (fitatos, compostos fenólicos e outros fitoquímicos) que podem interferir no isolamento ou no produto final (ALUKO, 2004).

3.3 PROTEÍNAS DE CHIA

A demanda por proteínas está aumentando nos últimos anos, especialmente na dieta humana, devido ao aumento da conscientização dos consumidores sobre alimentação e valores funcionais. A crescente demanda por proteínas vegetais ocorre devido a maior disponibilidade na natureza, menor custo de produção e a preferência de alguns consumidores com base nas suas crenças religiosas e necessidades dietéticas. As proteínas das sementes estão chamando atenção, uma vez que são relativamente abundantes, facilmente digeríveis e contém níveis elevados de aminoácidos. As proteínas vegetais também têm efeitos contra algumas doenças crônicas degenerativas (KRAJCOVICOVA-KDULACKOVA; BABINSKA; VALACHOVICOVA, 2005).

Na farinha de sementes de chia, a exigência de aminoácidos para crianças são cerca de 100% satisfatória para os aminoácidos sulfurados; já para os aminoácidos essenciais remanescentes variam de 52 a 76%. Por outro lado, a quantidade necessária é muito melhor para os adultos; os aminoácidos essenciais na farinha de sementes variam de 66 a 126% comparado ao padrão FAO/WHO/UNU (2008) de requisitos de aminoácidos para dois grupos etários extremos (0,5-1 e > 18 anos). Além disso, é interessante salientar que a porcentagem de aminoácidos essenciais é cerca de 50% (46,5%), o que é muito superior ao correspondentes valores reportados para soja (41,0%) e cártamo (38,1%); este é um aspecto importante em favor da qualidade das proteínas de chia. Em geral, a qualidade proteica da chia tem sido demonstrada como sendo superior a alguns cereais e oleaginosas; isso pode representar uma importante contribuição nutracêutica aos alimentos que contem chia (SANDOVAL-OLIVEROS; PAREDES-LÓPEZ, 2013).

Os concentrados e os isolados de proteínas vegetais são usadas para substituir total ou parcialmente as proteínas lácteas em muitos alimentos processados. Geralmente, as proteínas são utilizadas em várias formulações alimentares, a fim de melhorar o seu desempenho. As

proteínas, os polipeptídeos e os aminoácidos essenciais além de promoção da saúde são também utilizados para conferir características, como estrutura, textura, flavour e cor em produtos alimentares formulados. Por outro lado, o teor de proteínas nas sementes de chia [19-23% (m/m)] é maior do que a maioria dos grãos tradicionalmente utilizados: trigo (14%, m/m), milho (14%, m/m), arroz (8,5%, m/m), aveia (15,3% m/m) e cevada (9,2%, m/m) (SANDOVAL-OLIVEROS; PAREDES-LÓPEZ, 2013). Os aminoácidos essenciais tais como leucina, isoleucina e valina compreendem a 42,2-42,9% de aminoácidos totais em sementes de chia. Esta proporção de aminoácidos essenciais na semente de chia é maior que em sementes oleaginosas comuns, como a soja. As sementes de chia são também ricas em aminoácidos não essenciais, como o ácido glutâmico, arginina e ácidos aspárticos. Sabe-se que o ácido glutâmico modula a resposta imuno regulatória e melhora o desempenho esportivo. Portanto, é considerado como um aminoácido importante na dieta. A arginina é também conhecida pela prevenção de doenças cardíacas (OLIVOS-LUGO; VALDIVIA-LOPEZ; TECANTE, 2010).

As principais proteínas das sementes de chia são proteínas de armazenamento representando cerca de 60-80% do total de proteína (SHEWRY et al., 2002) e sua análise é complicada pela heterogeneidade dos polipeptídeos e os diferentes comportamentos de solubilidade. Embora as propriedades físico-químicas das proteínas de chia tenham sido estudadas (OLIVOS-LUGO; VALDIVIA-LOPEZ; TECANTE, 2010; SANDOVAL-OLIVEROS; PAREDES-LÓPEZ, 2013; VÁZQUEZ-OVANDO et al., 2010), existem controvérsias sobre o predomínio das globulinas [52 e 65 g 100g⁻¹ de proteína] (SANDOVAL-OLIVEROS; PAREDES-LÓPEZ, 2013; VÁZQUEZ-OVANDO et al., 2010) e prolaminas [53,8 g 100 g⁻¹ de proteína] (OLIVOS-LUGO; VALDIVIA-LOPEZ; TECANTE, 2010) nas frações de proteínas de chia. Uma compreensão clara dos efeitos dos diferentes processos utilizados para obter produtos com alto teor de proteína continua limitada.

3.4 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

Para obter produtos com um alto conteúdo de um componente particular, existem vários métodos e processos envolvidos. Os procedimentos que são utilizados para a extração das proteínas podem afetar as propriedades da mesma e provocar a desnaturação, formação de novos complexos de proteínas, degradação de aminoácidos, reação de Maillard, redução da digestibilidade de aminoácidos, entre outros (COELHO; SALAS-MELLADO, 2015). A utilização das proteínas vegetais como aditivos em alimentos depende grandemente das suas características funcionais. A relação da qualidade da proteína com parâmetros de

processamento de como afetam o desempenho funcional de produtos proteicos é digno de extensa investigação (JANE; RIVAS; JOHN, 1981).

Recentemente, há diversos estudos avaliando a influência do método de extração nas características físico-químicas das proteínas. Timilsena et al. (2016b) isolou a proteína de sementes de chia australianas e testou diferentes métodos de secagem em pó: *spray dryer*, congelamento à vácuo e liofilização para investigar o efeito dos métodos de secagem nos atributos físico-químicos e funcionais. Tirgar et al. (2017) verificaram que o rendimento, a composição e as propriedades dos concentrados proteicos de semente de linho foram significativamente influenciadas pelos métodos de extração (precipitação isoeletrica, extração enzimática e extração com solvente). Stone et al. (2015) estudaram a obtenção de isolados proteicos preparados a partir de três cultivares de ervilha por extração alcalina/precipitação isoeletrica, extração por diálise e precipitação micelar, avaliadas quanto à sua superfície (carga, hidrofobicidade) e propriedades funcionais (capacidade de absorção de água/óleo, solubilidade, e capacidade/estabilidade de emulsão e formação de espuma). Feyzi, Milani e Golimovahhed (2018) centraram-se no efeito da extração de pH (2, 5 e 10), tempo (20 e 80 min) e proporção de água:farinha (5:1 e 30:1 p v⁻¹) sobre a processo de extração e caracterização de proteína isolada de ervilhas.

Em tratamentos úmidos, uma desvantagem inerente é a perda de proteínas solúveis, pois segundo Bergthaller et al. (2001) a precipitação isoeletrica utilizada na produção de concentrados de proteínas traz o risco de perda da fração das vicilinas (proteínas de armazenamento 7S). As modificações estruturais de alguns componentes, bem como a perda de compostos de natureza fenólica com potencial para conferir atividade antioxidante são outras desvantagens (VÁZQUEZ-OVANDO et al., 2010). Segundo Nolsøe e Undeland (2009) o processo de solubilização ácida ou alcalina foi desenvolvido na Universidade de Massachusetts (Massachusetts Marine Station, Gloucester, MA, USA). Este processo utiliza o princípio de que um material homogeneizado em água é afetado pelo pH. Em condições de pH extremo, ácido ou alcalino, mudanças ocorrem nas cargas das proteínas promovendo a repulsão entre elas e consequentemente a sua interação com a água, ou seja, a sua solubilização. Esse princípio se iniciou com músculo de pescado, porém hoje se utilizam diferentes fontes proteicas, como sementes, cereais, leguminosas e oleaginosas.

A principal vantagem do fracionamento a seco é a simplicidade do processamento, juntamente com a diminuição ou nulidade no uso de água ou outros solventes com a consequente vantagem de que não são gerados efluentes ou resíduos (VÁZQUEZ-OVANDO et al., 2010). Os processos de fracionamento à seco foram utilizados de forma eficiente na

preparação, por exemplo, de amidos e proteínas de leguminosas, conforme relatado por Otto, Baik e Czuchajowska (1997), que forneceram um fracionamento a seco de farinha de grão de bico produzindo rendimentos de 52% da fração externa do grão-de-bico composta principalmente por fibra. Vázquez-Ovando et al. (2010) selecionaram a malha de 100 mesh como o melhor tratamento para obtenção de rendimentos de 446,2 g kg⁻¹ b.s. para a fração rica em proteína (> 140 µm) e 295,6 g kg⁻¹ b.s. para as fibras (< 140 µm) da farinha de chia.

A necessidade de ter novas fontes de produtos ricos em fibras e proteínas é estimulado pelos benefícios que lhe são atribuídos, uma vez que são recomendados suplementos de fibras para o tratamento da síndrome do intestino irritável, consequentemente para a melhoria do trânsito intestinal (SINGH; MAKHARIA; JOSHI, 2008). Verificou-se também que produtos ricos em fibras e proteínas ajudam a redução de 12,8% dos níveis plasmáticos de colesterol associado à lipoproteína de baixa densidade (LDL) e 12,3% de glicose (ALLER et al., 2004).

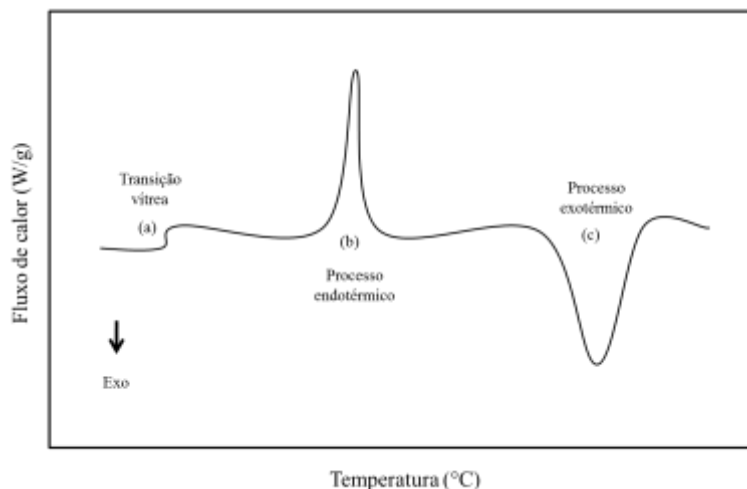
3.5 ANÁLISES DE CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS

3.5.1. Calorimetria diferencial de varredura

O método de calorimetria diferencial de varredura (DSC) permite obter a quantidade de calor absorvido (endotérmico) ou liberado (exotérmico) por uma amostra quando comparada a uma referência durante um ensaio isotérmico ou não-isotérmico (aquecimento ou resfriamento) (BROWN, 1998; LUCAS; SOARES; MONTEIRO, 2001; WUNDERLICH, 1997). No ensaio de DSC não isotérmico de aquecimento a amostra e a referência (normalmente uma cápsula vazia) são aquecidas a uma taxa constante e a diferença de energia necessária para aquecê-las é medida. Inicialmente a energia necessária para aquecer a amostra e a referência é constante, porém, durante transições, a amostra requer maior (endotérmica) ou menor (exotérmica) energia do que a referência para que ambas permaneçam com a mesma temperatura. Ou seja, quando a amostra absorve energia (endotérmico) o equipamento estabiliza a temperatura fornecendo-lhe a energia necessária.

O registro da curva de DSC é expresso em termos de fluxo de calor (miliwatts, mW) versus temperatura (°C) ou tempo (min). Um termograma (curva) típico de DSC é mostrado na Figura 2, onde três tipos básicos de transformações são detectados: transformações endotérmicas, exotérmicas e transições de segunda ordem, como a temperatura de transição vítrea (T_g) (LUCAS; SOARES; MONTEIRO, 2001).

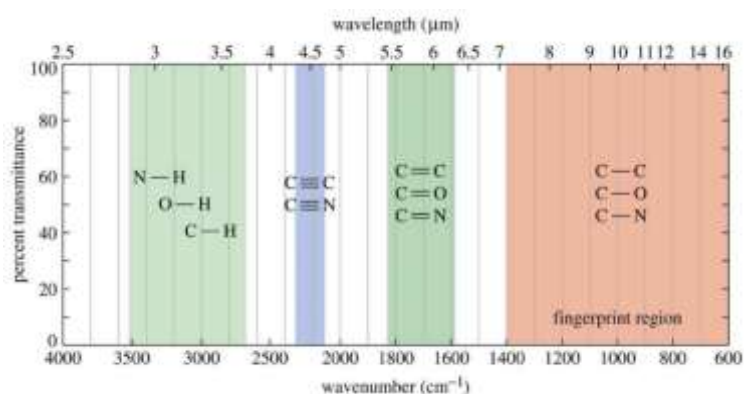
Figura 2 - Curva típica de uma análise térmica diferencial (DSC), (a) variação da capacidade calorífica ou T_g , (b) processo endotérmico, (c) processo exotérmico



3.5.2. Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

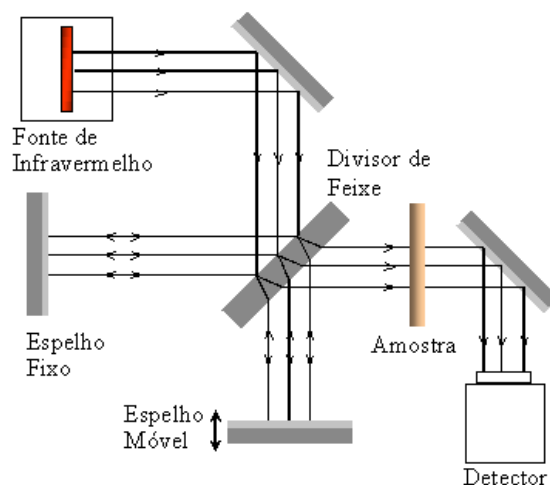
A espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) é uma das espectroscopias vibracionais cujas bandas espectrais são função da força das ligações químicas e das massas dos átomos envolvidos nessas ligações. Por isso é extremamente útil para a identificação de componentes de moléculas orgânicas como os grupos O-H, N-H, C=O, C-N, C-O, que são os principais constituintes das proteínas, açúcares, DNA, ácidos graxos, entre outras moléculas. A Figura 3 apresenta as principais bandas de absorção de FTIR e a sua localização no espectro. Os espectrofotômetros FTIR têm por base o interferômetro de Michelson. Neste sistema a radiação da fonte luminosa é dividida em dois feixes iguais através de um divisor de feixe, como se pode observar na Figura 4.

Figura 3 - Principais bandas de absorção em FTIR e a sua localização no espectro eletromagnético



Fonte: adaptado de OSBORNE (2000)

Figura 4 - Representação esquemática de uma medida por espectroscopia por transformada de Fourier de absorção no infravermelho



Fonte: UNESP (2017)

Um dos feixes segue em direção a um espelho de posição fixa no qual reflete de volta para o divisor de feixe, e aqui volta a dividir-se e parte desta vai para o detector. O outro feixe parte do divisor de feixe em direção ao espelho móvel, este espelho também reflete, ocorrendo nova divisão do divisor de feixe e parte da radiação segue também para o detector, conseguindo assim, com rapidez percorrer todos os comprimentos de onda em estudo. À medida que o espelho móvel percorre determinada distância um interferograma é formado com a recombinação dos dois feixes. Deste modo, um interferograma é formado pela soma de todas as ondas de diferentes amplitudes e frequências que chegam ao interferômetro. Contudo, apesar de o interferograma conter toda a informação fornecida pelo espectrofotômetro, a forma como a apresenta não é muito útil, assim esta informação é convertida num espectro, relacionando as intensidades com as respectivas frequências, através da transformada de Fourier (PERKINS, 1986).

3.5.3. Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) tem sido uma ferramenta de trabalho utilizada pelos pesquisadores em várias áreas de concentração, uma vez que ela abrange um conjunto de técnicas que possibilitam a caracterização da morfologia do material e composição química. O MEV é um dos mais versáteis instrumentos disponíveis para a observação e análise de características microestruturais de objetos sólidos. A principal razão de sua utilidade é a alta resolução que pode ser obtida quando as amostras são observadas; valores da ordem de 2 a 5

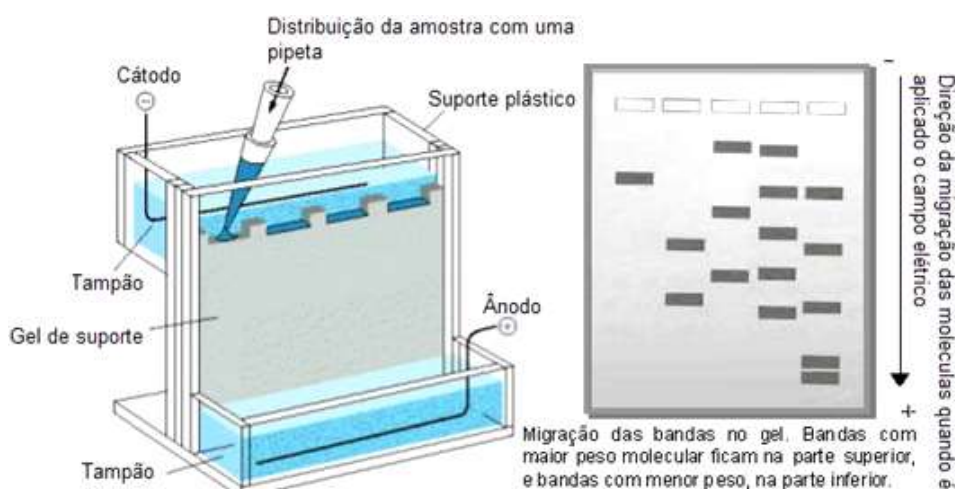
nanômetros são geralmente apresentados por instrumentos comerciais, enquanto instrumentos de pesquisa avançada são capazes de alcançar uma resolução melhor que 1 nm (NAGATANI et al. 1987).

O princípio de funcionamento do microscópio eletrônico de varredura consiste em um feixe de elétrons de pequeno diâmetro que explora a superfície da amostra, ponto a ponto, por varredura em linhas sucessivas, onde o sinal é transmitido a um detector e este a uma tela catódica. As bobinas de exploração magnéticas, alimentadas por um gerador de varredura, fazem com que o feixe explore a superfície da amostra aproximadamente de 10 em 10 nm. O sinal de imagem resulta da interação do feixe de elétrons incidente com a superfície da amostra. O detector é quem recebe o sinal e modula o brilho do monitor, permitindo a observação (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

3.5.4. Análise eletroforética

A eletroforese é uma técnica que permite a separação de diferentes tipos de proteínas em um suporte que, normalmente, pode ser acetato de celulose, gel de agarose ou em gel de poliacrilamida. A eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) pode ser conduzida com a proteína em sua forma nativa (eletroforese simples) ou com a proteína desnaturada pela ação de dodecil sulfato de sódio (SDS). Por este motivo, tal técnica é também conhecida como SDS-PAGE (SGARBIERI, 1996), como apresentado na Figura 5.

Figura 5 - Esquema representativo da técnica de eletroforese SDS-PAGE



Com esta técnica, SDS-PAGE, as amostras são desnaturadas pelo calor na presença de reagentes desnaturantes como o β -mercaptoetanol, que destrói as ligações dissulfeto das

proteínas, e o detergente SDS. O SDS, determinante iônico, rodeia as cadeias proteicas, desnaturando-as e cobrindo a proteína com cargas negativas. Deste modo, a carga intrínseca à proteína, que é variável em função dos aminoácidos que a constituem e do pH da solução que a contém, é “mascarada” pelo detergente, tornando-se a razão carga/massa constante. Assim, é possível que as proteínas, agora carregadas negativamente, sejam separadas em função do seu tamanho (SGARBIERI, 1996).

O gel de poliacrilamida, entre outros reagentes, é constituído por uma mistura de dois polímeros: acrilamida e bis-acrilamida. A acrilamida é uma molécula linear, enquanto a bis-acrilamida apresenta-se em forma de "T". Misturando-se estes dois polímeros, obtemos uma matriz, gel poroso, como se tivéssemos uma rede com uma malha mais ou menos apertada. O diâmetro dos poros é controlado e definido através da concentração deste polímero. Assim, quanto maior a concentração de acrilamida, menores serão os poros da matriz. Dependendo do seu tamanho, cada proteína migra de forma diferenciada ao longo do gel: proteínas de menor tamanho molecular migrarão mais rapidamente, enquanto que as de maior tamanho terão mais dificuldade em atravessar a “rede” do gel e, assim, movem-se mais lentamente. Os géis nesta técnica apresentam uma particularidade, possuem duas fases: a de concentração (*stacking*) e a de resolução ou de corrida (*running*), permitindo que as amostras proteicas colocadas em cada poço (espaço na extremidade superior do gel onde se coloca cada uma das amostras) sejam concentradas antes da corrida no gel, aumentando-se assim, a resolução das proteínas.

Como as proteínas, na sua maioria, não são moléculas coradas, a posição das bandas correspondentes, após a conclusão da eletroforese, é difícil de determinar. Esta limitação é minimizada, aplicando um corante que se liga fortemente às proteínas, mas a ligação ao gel de poliacrilamida é fraca. Para garantir que, as proteínas separadas não se movam no gel, após a finalização da eletroforese, estas são normalmente “fixadas” ao gel com ácido acético, que é um bom fixador. Após o passo da fixação, as proteínas são coradas com o Azul de Coomassie (*Coomassie Brilliant Blue*) ou a Coloração de Prata (*Silver Staining*).

3.6 PROPRIEDADES FUNCIONAIS DAS PROTEÍNAS

As proteínas são ingredientes utilizados em uma ampla gama de formulações devido ao seu valor nutricional e funcionalidade (O’SULLIVAN; O’MAHONY, 2016). O termo "funcionalidade" aplicado aos ingredientes alimentares descreve qualquer propriedade que não seja atributos nutricionais que contribuam para os aspectos benéficos de um ingrediente dentro de uma formulação (DAMODARAN, 1997). As proteínas são moléculas altamente funcionais

em sistemas alimentares capazes de estabilizar gotículas de óleo e bolhas de ar, formações de estruturas de gel e o aumento da viscosidade (O'CONNELL; FLYNN, 2007). Essa funcionalidade é devido à composição química complexa dessas moléculas devido às suas sequências de aminoácidos únicas (BEVERUNG; RADKE; BLANCH, 1999). A melhoria das propriedades funcionais das proteínas é de grande interesse para aumentar o seu valor comercial e melhorar a utilização desses ingredientes de alto valor (DRAPALA et al., 2015; GRIGOROVICH et al., 2012; KURUKJI; NORTON; SPYROPOULOS, 2016; MALAKI NIK; WRIGHT; CORREDIG, 2010; MULCAHY; MULVIHILL; O'MAHONY, 2016; O'SULLIVAN et al., 2014).

A solubilidade de uma proteína é um dos atributos funcionais críticos e necessário para a sua utilização como ingrediente alimentar, porque a solubilidade influencia muito outras propriedades, como a emulsificante, a gelificante e a formação de espuma (WANG; KINSELLA, 1981). Essas propriedades são características físico-químicas intrínsecas, que afetam o comportamento das proteínas no sistema alimentar durante o processamento, fabricação, armazenamento e preparação (KINSELLA, 1979). As proteínas têm propriedades únicas de superfície devido à seu grande tamanho molecular e suas propriedades anfífilas. No entanto, as aplicações industriais de proteínas em alimentos limitam-se, porque as proteínas são geralmente instáveis ao aquecimento, solventes orgânicos e ataque proteolítico (SAKAMOTO; KUMAZAWA; MOTOKI, 1994).

Recentemente, muitos estudos tem sido realizados sobre as propriedades funcionais de proteínas vegetais (FERREIRA et al., 2018; MA; BOYE; SIMPSON, 2016). Propriedades funcionais de proteína isolados, como a capacidade de absorção de água e óleo, bem como a capacidade e estabilidade da espuma, são variáveis importantes para definir sua viabilidade em pães, massas, salsichas, coberturas e bebidas, mas são influenciados pela composição de aminoácidos, estrutura e conformação das proteínas, e interferem na aceitabilidade dos consumidores (WANI et al., 2015; BOYE et al., 2010). A espuma é uma propriedade funcional de grande importância para a aplicação da proteína isolada em bebidas, mousses, merengues e coberturas (BOYE et al., 2010). Quando não atendem satisfatoriamente aos requisitos de funcionalidade, as proteínas podem ser modificadas visando a melhoria desta característica.

3.6.1. Solubilidade

A solubilidade de uma proteína é definida como a porcentagem de proteína que se mantém em solução ou dispersão coloidal sob condições específicas e que não sedimenta com

forças centrífugas moderadas. Para que uma proteína seja solúvel, ela deve interagir com o solvente, geralmente através de ligações de hidrogênio, interações do tipo dipolo-dipolo e iônicas; por isso esta propriedade pode ser também definida como o equilíbrio entre as interações proteína-proteína e proteína-solvente (ORDÓÑEZ, 2005).

Uma boa solubilidade conduz a aplicação da proteína para a produção de bebidas, molhos, sopas desidratadas, purês, etc. A solubilidade de uma proteína poderá ser modificada pela influencia de vários fatores como pH, força iônica, constante dielétrica do solvente e temperatura (SGARBIERI, 1996). A solubilidade em pH neutro ou no ponto isoelétrico (PI) costuma ser a primeira propriedade tecnológica que se mede de um ingrediente proteico, já que as proteínas insolúveis têm pouca aplicação na indústria alimentícia. Em pH diferentes do ponto isoelétrico, as proteínas possuem cargas líquidas e repelem-se entre si, podendo interagir com as moléculas de água, sendo portanto, mais solúveis. Quando se representa a solubilidade de determinada proteína em função do pH, obtêm-se normalmente curvas em forma de U, onde a solubilidade mínima ocorre no PI. Para um grande número de proteínas o PI está entre o pH 3,5 e 6,5. Entretanto, diferentes comportamentos de solubilidade em função do pH podem ser observados para misturas de proteínas, tais como concentrados proteicos de soro de leite, caseinatos, ou em sistemas alimentícios (ORDÓÑEZ, 2005; VOJDANI, 1996).

A solubilidade de uma proteína depende grandemente do número e do arranjo de cargas na molécula, que por sua vez, dependerá da composição de aminoácidos, particularmente do número de resíduos ácidos (aspartil, glutamil) e básicos (histidil, arginil, lisil). Componentes não proteicos da molécula como lipídios, carboidratos e fosfatos também afetam a solubilidade das proteínas (SGARBIERI, 1996). A solubilidade é determinada como a primeira propriedade funcional de uma proteína, em cada etapa de preparação ou de transformação de um ingrediente proteico, uma vez que o grau de insolubilidade é, provavelmente, a medida mais prática da desnaturação – agregação proteica (CHEFTEL; CUQ; LORIENT, 1989). As proteínas que, inicialmente, estão no estado desnaturado ou parcialmente agregado, mostram, frequentemente, um decréscimo da capacidade de gelificação, emulsão ou formação de espuma. Do ponto de vista prático, os valores de solubilidade estabelecem:

- ✓ As condições ótimas de extração;
- ✓ As informações gerais sobre aplicações potenciais de proteínas em sistemas líquidos e em relação às demais propriedades funcionais dependentes de suas interações com a água;
- ✓ As condições úteis sobre a otimização de processamento;
- ✓ As condições de determinação dos efeitos do tratamento térmico, que podem afetar suas aplicações potenciais.

Outras propriedades funcionais (emulsificação e formação de espuma) são afetadas pela solubilidade. Quando essas propriedades funcionais são requeridas, uma proteína altamente solúvel é necessária. Proteínas com baixa solubilidade têm propriedades funcionais limitadas (WILDING, 1984).

3.6.2. Capacidade de absorção de água e óleo

A determinação da capacidade de absorção de água e óleo em alimentos à base de proteína é de extrema importância para a indústria de alimentos. A capacidade de ligar água e óleo determina não somente a aceitabilidade sensorial de um dado produto, mas também a sua margem de lucro. Os consumidores tendem a evitar produtos que mostram a exsudação de água no interior da embalagem. Além disso, formulações que resultam em baixas capacidades de ligar água e óleo se traduzem em perdas de líquidos durante o processamento (BARBUT, 1996).

As propriedades de hidratação das proteínas estão diretamente relacionadas a fatores intrínsecos da própria molécula, isto é, com sua composição de aminoácidos e sua conformação. As proteínas interagem com a água mediante ligações de hidrogênio, ligações dipolo-dipolo ou cadeias laterais dos aminoácidos (interações com grupos ionizados). Assim, quando há proporção maior de aminoácidos com cadeias laterais hidrofóbicas, a proteína apresenta capacidade menor de hidratação do que quando é composta por aminoácidos com cadeias laterais hidrofílicas, que podem estabelecer mais facilmente ligações de hidrogênio com a água. Também influi na capacidade de hidratação a conformação das proteínas, bem como a organização tridimensional dessas cadeias ordenadas, estabilizadas mediante uniões hidrofóbicas, interações eletrostáticas, ligações de hidrogênio e ligações covalentes (estrutura terciária) (ORDÓÑEZ, 2005).

A atração hidrofílica poderá ser medida como grau de hidratação ($g_{\text{água}} g_{\text{proteína}}^{-1}$), onde relaciona-se com a quantidade de água que permanece na proteína ou alimento proteico após exposição a um excesso de água e aplicação de uma força de centrifugação ou pressão (SGARBIERI, 1996). Os teores de capacidade de ligação com água têm sido relacionados para descrever a quantidade máxima de água que uma proteína pode absorver, devido às pontes de hidrogênio que existem entre as moléculas de água e os grupos polares das cadeias proteicas (PATEL; FRY, 1987). A absorção de óleo varia em função do número de grupos hidrofóbicos expostos da proteína e embora não tenha sido esclarecido, o mecanismo envolvido na interação proteína-óleo parece ser puramente físico, relacionado com as cadeias de aminoácidos hidrofóbicos existentes na molécula proteica (LIN; ZAYAS, 1987).

3.6.3. Propriedade emulsificante

Uma emulsão pode ser definida como uma mistura de dois líquidos imiscíveis, um dos quais é disperso na forma de glóbulos no outro líquido. Podem ser reconhecidos dois tipos de emulsão, dependendo da composição das fases. Quando a água é a fase contínua (externa) e o óleo ou gordura a fase interna (descontínua) tem-se uma emulsão de óleo em água. Quando a água é a fase interna e o óleo a fase externa tem-se uma emulsão de água em óleo (SGARBIERI, 1996).

O que torna uma emulsão estável é a presença de um agente emulsificante, o qual diminui a tensão superficial existente entre duas fases e permite a formação de emulsão com um nível mais baixo de energia. A principal característica de um agente emulsificante é a de possuir na mesma molécula partes hidrofílicas e hidrofóbicas, o que permite a formação de uma camada entre as duas fases, separando-as e impedindo que os glóbulos da fase interna coalesçam, o que resultaria em quebra da emulsão. Emulsificantes mais polares são mais úteis na formação e estabilidade da emulsão do tipo óleo em água; os menos polares são mais aplicáveis em emulsões de água em óleo. As proteínas são excelentes emulsificantes para os sistemas óleo em água, mais comumente encontrados em alimentos. Dois aspectos interessam em uma emulsão:

1. A capacidade de emulsificação, ou seja, a quantidade de lipídios que as proteínas são capazes de emulsificar;
2. Estabilidade da emulsão, que mede a capacidade que têm as proteínas de manter a mistura em uma força homogênea, quando submetida a ação de uma força ou calor.

Alguns dos fatores que afetam a formação e a estabilidade de uma emulsão são: temperatura, tamanho de partícula de gordura, pH, quantidade e tipo de proteína e viscosidade da emulsão (SGARBIERI, 1996).

3.6.4. Propriedade espumante

A capacidade de uma proteína em formar espuma refere-se a expansão de volume da dispersão proteica com a incorporação de ar por batimento, agitação ou aeração. É uma propriedade funcional de interfase que depende da natureza da proteína, da solubilidade, e do estado de desnaturação da proteína, da presença de sais e de outros aditivos utilizados no processamento de alimentos. O que se pretende medir, normalmente, é a expansão de volume da suspensão de proteína, imediatamente após o batimento ou aeração, representada pelo

volume de espuma formado. A estabilidade de espuma diz respeito a retenção do volume máximo da espuma formada em função do tempo de repouso sendo geralmente medida pela liberação de fluido da espuma (SGARBIERI, 1996).

Na formação de um sistema espumante com proteínas, estudos relatam que são observados três estágios sequenciais:

1. Difusão da proteína solúvel para a interface onde se concentra. Nesse estágio, a tensão superficial é reduzida;
2. Desdobramento do polipeptídeo na interface com reorientações (polar-água, apolar-ar) e;
3. Interação entre as cadeias polipeptídicas para formar filmes contínuos.

As espumas são mais estáveis na região do PI das proteínas, em razão da repulsão eletrostática mínima, que promove uma interação mais favorável entre proteína-proteína, formando um filme viscoso na interface (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). Segundo Cheftel, Cuq e Lorient (1989), embora muitos estudos ressaltem a importância de uma alta solubilidade de proteína para que se manifestem elevadas capacidade e estabilidade espumante, é aceito que as partículas proteicas insolúveis possam ter um papel benéfico na estabilidade da espuma. A alta estabilidade de espuma de muitas proteínas no PI pode ser explicada pelo fato de que as atrações eletrostáticas intermoleculares, que se produzem no PI, aumentam a espessura e a rigidez das proteínas adsorvidas na interface ar-água.

A desnaturação parcial por calor melhora as propriedades de formação de espuma das proteínas. Por exemplo, o aquecimento da proteína a 70 °C durante 1 min. aumenta as propriedades de formação de espuma, enquanto o aquecimento a 90 °C durante 5 min. as diminuem, embora as proteínas aquecidas permaneçam solúveis em ambos os casos. A diminuição das propriedades de formação de espuma da proteína aquecida a 90 °C deve-se a extensa polimerização da proteína por meio das reações de troca dissulfeto-sulfidrila. Proteínas com altos teor de ligação cruzada e de polimerização não são capazes de se adsorverem à interface ar-água durante a formação de espuma (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

3.6.5. Propriedade gelificante

A formação de um gel confere estrutura e estabilidade a diversos alimentos, daí a sua importância em aplicações alimentares, na medida em que constitui uma matriz estrutural de retenção da água e de outros ingredientes alimentares, como açúcares, gorduras e compostos aromáticos. Para géis proteicos, procede-se inicialmente à desnaturação das proteínas através

do seu aquecimento. Em seguida, efetua-se um arrefecimento, onde se verifica o estabelecimento de ligações entre as cadeias peptídicas das proteínas e a formação de uma rede tridimensional. Nesta associação estão envolvidas ligações covalentes e não covalentes: pontes dissulfeto, interações hidrofóbicas, ligações por pontes de hidrogênio e ligações iônicas (POMERANZ, 1991).

A formação do gel passa por uma etapa anterior designada por sol que, em termos físicos, corresponde a uma suspensão coloidal e que, por arrefecimento vai passar a gel através de uma associação das cadeias proteicas. Quando as cadeias estão suficientemente organizadas, de modo a formarem a rede de gel e à medida que a organização das redes vai se intensificando, o gel torna-se rígido e ocorre geralmente o fenômeno de sinérese, ou seja, o gel contrai-se e exsuda uma parte da fase líquida (NUNES et al., 2003).

A estabilidade da estrutura do gel contra as forças térmicas e mecânicas depende do número e dos tipos de ligações cruzadas formadas pelas cadeias de monômeros. Termodinamicamente, a estrutura do gel seria estável apenas quando a soma das energias de interação de um monômero na rede de gel fosse maior do que sua energia cinética térmica. Isso depende de vários fatores intrínsecos (como tamanho, carga líquida e etc) e extrínsecos (tais como pH, temperatura, força iônica e etc). Outro fator crítico é a concentração de proteína. Para formar uma rede de gel que se mantenha sozinha, exige-se uma concentração mínima de proteína, conhecida como o menor ponto de equivalência (LCE – *least concentration endpoint*). O LCE é 8% para as proteínas de soja, 3% para a albumina de ovo e cerca de 0,6% para a gelatina. Acima dessa concentração mínima, a relação entre a força do gel, G , e a concentração da proteína, C , segue uma lei exponencial, apresentada na Eq. (1):

$$G \propto (C - C_0)^n \quad (1)$$

Onde C_0 é o LCE. Para as proteínas o valor de n varia de 1 a 2 (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

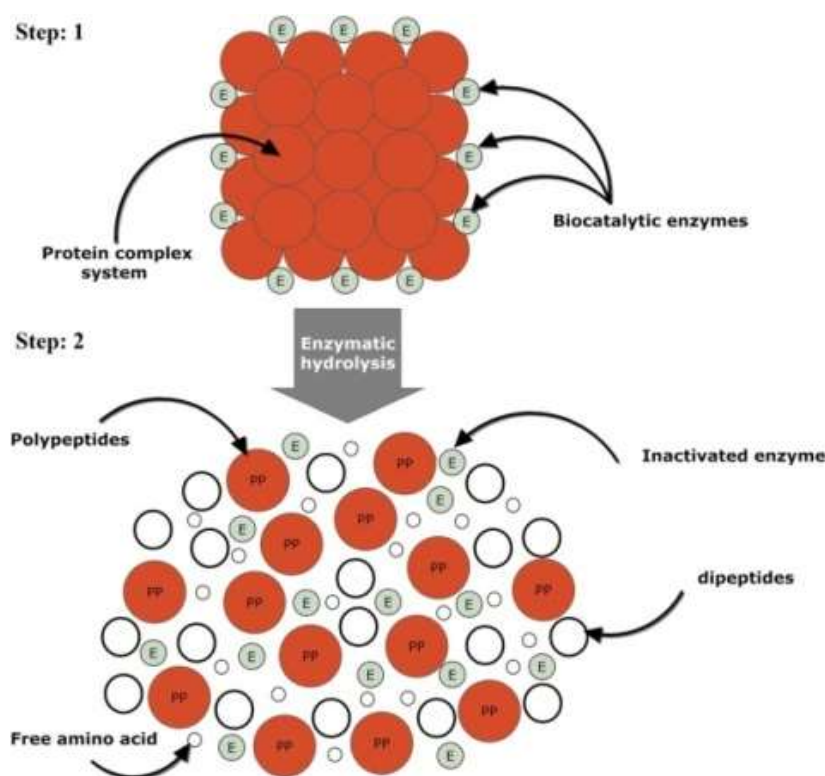
3.7 HIDRÓLISE PROTEICA

Os peptídeos bioativos são fragmentos de proteínas que podem produzir vários efeitos bioquímicos e fisiológicos no corpo humano e, podem ser sintetizados quimicamente como uma molécula única ou produzidos a partir das proteínas nativas por hidrólise enzimática (Figura 6),

produzindo uma mistura de peptídeos, referidos como hidrolisados (BOSCHIN et al., 2014; LULE et al., 2015).

No primeiro caso, os peptídeos sintetizados possuem uma sequência racionalmente projetada e estão bem identificados (KYLE et al., 2009). A hidrólise enzimática é um método baseado na adição de enzimas para clivagem das proteínas, sendo um processo usado para aperfeiçoar ou modificar as propriedades químicas, funcionais e sensoriais da proteína sem prejudicar o seu valor nutricional. O processo enzimático ocorre sob condições brandas, sem produzir produtos de degradação. Este tipo de hidrólise oferece vantagens porque permite um bom controle do processo e, conseqüentemente, das propriedades dos produtos resultantes. Os hidrolisados são cada vez mais usados em formulações alimentares para desempenhar propriedades funcionais específicas. A composição do hidrolisado é regida pela especificidade enzimática, a relação enzima:substrato, a extensão da hidrólise e as condições físico-químicas aplicadas (GAUTHIER et al., 1993; KRISTINSSON; RASCO, 2000a).

Figura 6 - Produção de hidrolisados proteicos antes (etapa 1: as enzimas estão no estado ativo) e após a (etapa 2: desativação de enzimas após hidrólise completa) hidrólise enzimática



Fonte: SAADI et al. (2015)

Primeiramente, a composição do hidrolisado depende da especificidade da enzima, que determina quais ligações peptídicas serão hidrolisadas e conseqüentemente, o número e o

tamanho dos peptídeos produzidos (DAREWICZ; DZIUBA; DZIUBA, 2006). Existem enzimas comerciais com especificidades bem conhecidas, sendo as mais comuns a tripsina, papaína, pronase, pepsina, bromelina, alcalase e quimotripsina (KUMAGAI, 2012).

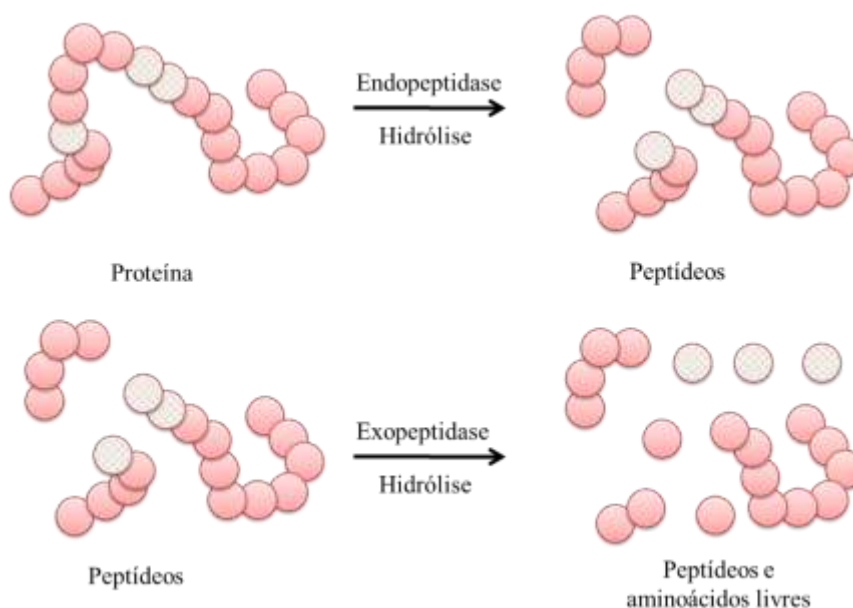
O segundo fator chave essencial para a hidrólise diz respeito à proteína utilizada como substrato, sua natureza, sua concentração e a extensão da sua desnaturação. Por exemplo, a desnaturação térmica de proteínas de soro de leite melhorou a extensão da sua hidrólise, expondo aminoácidos previamente inacessíveis na proteína nativa para a clivagem e, como resultado, alterando o tipo e o número de peptídeos produzidos em comparação com a proteína nativa (TAVANO, 2013).

O terceiro parâmetro está ligado às condições em que a hidrólise é realizada, ou seja, a relação enzima:substrato, o pH, a força iônica, a temperatura e o tempo de reação que podem afetar a atividade enzimática, a acessibilidade ao substrato e eventualmente mudar a composição final do hidrolisado (AMIZA; KONG; FAAZAZ, 2012; NEKLYUDOV; IVANKIN; BERDUTINA, 2000; PANYAM; KILARA, 1996; YIN et al., 2010).

Muitas técnicas diferentes estão disponíveis para monitorar e controlar a produção de peptídeos e fornecer informações adicionais. O mais utilizado para quantificar um hidrolisado é o grau de hidrólise de proteínas (GH), que se refere à proporção de ligações peptídicas clivadas por número total de ligações existentes na proteína e que varia de 0 a 100% dependendo das proteínas intactas e a conversão completa de proteínas em aminoácidos, respectivamente (LICEAGA-GESUALDO; LI-CHAN, 1999; MAHMOUD, 1994; PANYAM; KILARA, 1996). Geralmente é determinado monitorando o pH ou quantificando os grupos livres de amino (NH_2) devido à facilidade com que isso pode ser feito (SPELLMAN et al., 2003). Na maior parte do tempo, quanto maior for o GH, menores serão o tamanho dos peptídeos (ADLER-NISSEN, 1976; GHRIBI et al., 2015; JAMDAR et al., 2010; QUAGLIA; ORBAN, 1987).

Para alcançar um determinado valor de GH, um grande número de enzimas exógenas são utilizadas com sucesso na produção de hidrolisados de proteínas de diferentes fontes. Um fator importante a considerar é a natureza da atividade enzimática, ou seja, sua atividade específica (VIOQUE et al., 2001). Neste sentido, as proteases podem ser divididas em dois grandes grupos de acordo com sua atividade catalítica: endopeptidases ou proteinases que hidrolisam as ligações internas das cadeias de peptídeos e, exopeptidases ou peptidases que hidrolisam aminoácidos e dipeptídeos das extremidades das cadeias polipeptídicas, como apresenta a Figura 7 (GUADIX, 2000). Esses últimos podem ser divididos em aminopeptidases se atuarem no N terminal ou carboxipeptidases se o fizerem pelo C terminal (VIOQUE et al., 2001).

Figura 7 - Classificação das enzimas de acordo com a sua atividade catalítica



3.8 ENZIMAS PROTEOLÍTICAS

A utilização de enzimas proteolíticas pode originar a quebra de ligações peptídicas e alterações na conformação molecular das proteínas, resultando peptídeos com propriedades funcionais e tecnológicas que permitem a criação de muitos segmentos de produtos (NAKAI; LI-CHAN, 1989). Entre as enzimas mais utilizadas estão a Alcalase e a Flavourzyme (HWANG et al., 2010). Além disso, as enzimas proteolíticas possuem também uma vasta aplicação comercial/industrial, estando entre os três maiores grupos de enzimas industriais e sendo responsáveis por 60% da venda internacional de enzimas. Na indústria alimentícia, as enzimas proteolíticas são largamente utilizadas para o amaciamento de carne e clarificação da cerveja — além do amaciamento de couro. Já na indústria farmacêutica, essas enzimas proteolíticas são empregadas em medicamentos para distúrbios de digestibilidade, tendo também ação anti-inflamatória, antimucolítica e cicatrizante.

A Alcalase é uma preparação enzimática comercial, produzida pela Novo Nordisk A/S, usada em formulações de detergentes para remover manchas a base de proteínas, como por exemplo, de sangue e de vários alimentos (ovos, molhos, etc). A Alcalase hidrolisa proteínas (nas manchas) em peptídeos que são facilmente dissolvidos ou dispersos no líquido de lavagem. Segundo a Novo Nordisk (1994), a Alcalase, classificada como uma subtilisina (EC 3.4.21.62), é uma serina-peptidase e endopeptidase, caracterizada pelo seu desempenho a altas temperaturas e moderada alcalinidade, sendo produzida por fermentação submersa de um

micro-organismo não patogênico do gênero *Bacillus*. A preparação enzimática comercial é disponível na forma granular e líquida. Enzimas granuladas são tratadas com tiosulfato de sódio, quando na forma líquida, e revestidas com sulfato de sódio após granulação. As enzimas líquidas encontram-se diluídas em um meio contendo monopropilenoglicol ou glicerol.

De acordo com Anwar e Saleemuddin (1998), a Alcalase é uma enzima proteolítica isolada de linhagens selecionadas de *Bacillus licheniformis*, sendo seu maior componente enzimático a subtilisina Carlsberg (formada por uma única cadeia polipeptídica com 274 resíduos de aminoácidos e massa molecular de aproximadamente 27.274 Da). As condições ótimas de desempenho da Alcalase são temperaturas entre 55 e 70 °C, e pH entre 6,5 e 8,5, dependendo do tipo de substrato. Tem-se provado repetidamente, por muitos pesquisadores, que é a melhor enzima usada na preparação de diversos hidrolisados proteicos (KRISTINSSON; RASCO, 2000). Embora a Alcalase venha sendo amplamente utilizada em várias aplicações biotecnológicas, sua especificidade não foi completamente caracterizada. Sabe-se que essa enzima hidrolisa principalmente ligações peptídicas contendo resíduos hidrofóbicos no lado carboxílico (ADLER-NISSEN, 1986).

A Flavourzyme é um complexo enzimático com atividade endopeptidase e exopeptidase associadas. É produzida por fermentação de um selecionado tipo de *Aspergillus oryzae* e seu pH ótimo está na faixa de 5,0 a 7,0. A temperatura ótima está em torno de 50 °C. A Flavourzyme pode ser usada para remoção do amargor de hidrolisados proteicos com baixos graus de hidrólise. Sua atividade declarada é de 500 LAPU g⁻¹ (Unidade Leucina Aminopeptidase). Um LAPU g⁻¹ é o acréscimo de enzima que hidrolisa 1 mmol de L-leucina-p-nitroanilida por minuto de acordo com o método analítico da NOVO NORDISK (1996). A hidrólise resulta na liberação de aminoácidos N-terminal de ordem sequencial Xaa+ Yaa-, onde Xaa representa o primeiro aminoácido hidrolisado e é preferencialmente leucina, mas pode ser outros, incluindo prolina. Yaa representa o segundo aminoácido hidrolisado e pode ser prolina (HAMMERSHØJ; NEBEL; CARSTENS, 2008).

3.9 PROPRIEDADES BIOATIVAS DOS HIDROLISADOS PROTEICOS

3.9.1. Atividade antioxidante

Os radicais livres são constantemente gerados através das reações fisiológicas normais nos seres humanos para diversas funções, como de sinalização, o que proporciona a defesa contra infecções (DHAVAL; YADAV; PURWAR, 2016). No entanto, quando produzido em

excesso, o funcionamento fisiológico celular é alterado devido à malformação da proteína, mutação do DNA, oxidação de fosfolipídios da membrana e modificação das lipoproteínas de baixa densidade (ALAIZ et al., 1994; LEE; KOO; MIN, 2004). Isso leva a vários distúrbios neurodegenerativos, tais como: diabetes, artrite, aterosclerose, câncer, doença de Alzheimer, doença de Parkinson e problemas de envelhecimento (HALLIWELL, 1994). Além disso, a peroxidação lipídica mediada por radicais livres nos produtos alimentares é um grande problema global na indústria de alimentos (SARMADI; ISMAIL, 2010).

Recentemente, as descobertas de antioxidantes naturais ganharam crescente interesse, pois o uso de antioxidantes sintéticos está sendo estritamente regulado devido aos potenciais riscos para a saúde. À base de plantas, os peptídeos antioxidantes, estão cada vez sendo mais estudados e considerados como antioxidantes alternativos para preservação de alimentos e proteção à saúde. Estes peptídeos bioativos podem ser liberados da molécula de proteína nativa através da digestão gastrointestinal, quimicamente *in vitro*, via hidrólise enzimática ou fermentação (BOSCHIN et al., 2014; ONUH et al., 2014). Numerosos estudos relataram propriedades antioxidantes de hidrolisados enzimáticos de várias fontes de proteínas: arroz (PHONGTHAI et al., 2018; YAN et al., 2015), batata (ZHANG; MU, 2017), linhaça (KARAMACÍ; KOSIŃSKA-CAGNAZZO; KULCZYK, 2016), cogumelos (KIMATU et al., 2017), noz (JAHANBANI et al., 2016), milho (ORTIZ-MARTINEZ et al., 2017), entre outras. As atividades antioxidantes desses hidrolisados têm sido relatada dependente da especificidade da enzima, massa molecular, grau de hidrólise e da composição de aminoácidos (ALASHI et al., 2014; HE et al., 2013).

3.9.1.1 Métodos *in vitro* da determinação da atividade antioxidante

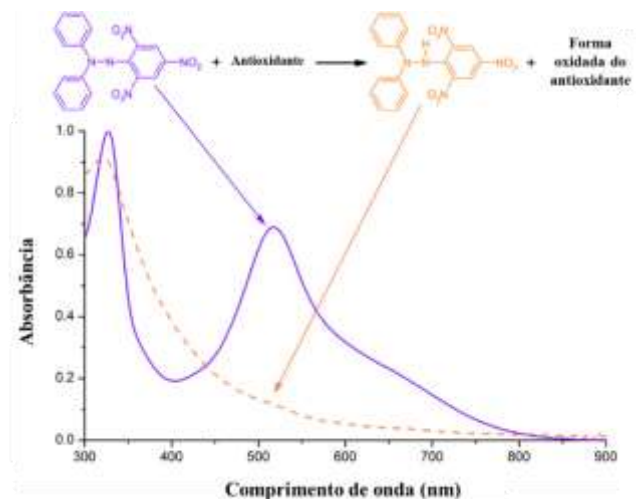
Existem diversos métodos para avaliar a atividade antioxidante *in vitro* em extratos ou substâncias isoladas, que apresentam diferenças no grau de complexidade, sensibilidade, mecanismos e espécies reativas envolvidas. De acordo com a reação envolvida, os métodos químicos para determinação da atividade antioxidante estão divididos em cinco grupos principais: aqueles baseados na prevenção da etapa de iniciação, incluindo sequestro do radical peroxil (ORAC), sequestro do radical 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS⁺) e atividade quelante do íon ferroso; aqueles baseados na inibição da formação de peróxido, incluindo a inibição da autooxidação do ácido linoléico; inibição da formação de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS); aqueles que se baseiam na capacidade de redução, incluindo a redução de potência, capacidade de redução de molibdato,

capacidade de redução do íon Ferro (FRAP) e sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) e; aqueles que se baseiam na capacidade de sequestro do radical oxigênio, incluindo o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($\text{OH}^\cdot$), ânion superóxido (O_2^-), oxigênio singlete, terc-butil peróxido (GOUFO; TRINDADE, 2014). Cada um desses ensaios podem independentemente representar mais de um dos mecanismos. Por outro lado, o mesmo composto antioxidante pode reagir de forma diferente em diferentes ensaios.

i. Capacidade de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH)

O ensaio do DPPH é considerado um método simples e rápido, cujo procedimento experimental pode ser facilmente adaptado para diferentes condições de análise (WOLLINGER et al., 2016), foi desenvolvido pela primeira vez por Blois (1958) e fundamenta-se na medida da capacidade dos antioxidantes em reduzir o radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH). O principal mecanismo do DPPH é a reação de transferência de elétron (HUANG; BOXIN; PRIOR, 2005). O método DPPH baseia-se na redução dos radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazil ($\text{DPPH}^\cdot$) através da doação de um átomo de hidrogênio pelo polifenol à molécula do radical. Para essa análise utiliza-se uma solução alcoólica de DPPH, que absorve no comprimento de onda próximo de 517 nm, e à medida que seu elétron deixa de ser desemparelhado, a absorção decresce e ocorre a mudança de coloração frente às moléculas antioxidantes testadas, como apresenta a Figura 8 (WOLLINGER et al., 2016).

Figura 8 - Reação entre o radical DPPH (violeta) e um antioxidante que produz a molécula de DPPH neutralizada (laranja). Os espectros UV/VIS correspondentes também são apresentados. Uma diminuição significativa da absorbância a 517 nm aparece durante a reação e pode ser usada para seguir a reação



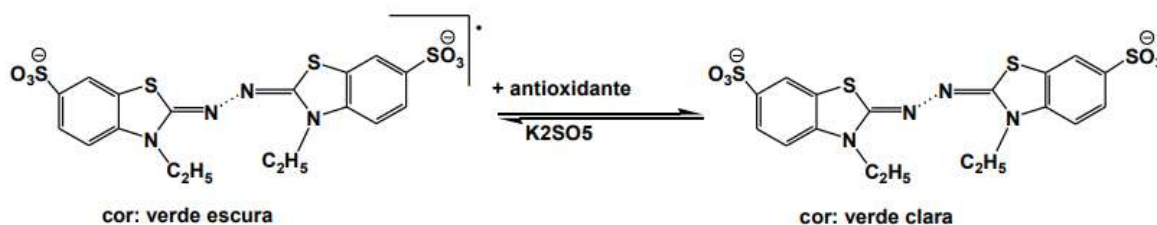
Fonte: WOLLINGER et al. (2016)

As vantagens do método DPPH são: avaliar uma grande quantidade de amostras em um período curto de tempo e rapidamente; um método sensível que detecta pequenas concentrações do ativo testado; permite avaliar antioxidantes lipofílicos, já que o solvente do processo é metanol ou etanol. Esse método apresenta em contrapartida, o pH do meio reacional, que é em torno de 5,5, é diferente do pH fisiológico, o que se constitui numa desvantagem pela dificuldade de transferir os resultados para as condições *in vivo* (DI MAMBRO; MARQUELE; FONSECA, 2005).

ii. Captura do radical 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS⁺)

Um dos métodos mais utilizados para medir a atividade antioxidante é através da captura do radical 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS⁺) (Figura 9), que pode ser gerado através de uma reação química, eletroquímica ou enzimática. Com essa metodologia, pode-se medir a atividade de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica (KUSKOSKI et al., 2005).

Figura 9 - Estabilização do radical ABTS⁺ por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio



Fonte: Adaptada de SOUSA et al. (2007)

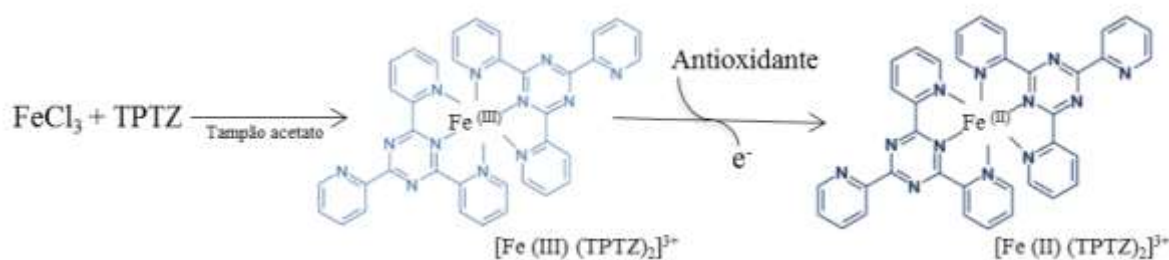
Com a adição de um antioxidante ocorre a redução do ABTS⁺ a ABTS promovendo a perda da coloração do meio reacional. Com a extensão da perda de cor, a porcentagem de inibição do ABTS⁺ é determinada em função de um padrão, Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) (RE et al., 1999).

iii. Capacidade de redução do íon Ferro (FRAP)

O ensaio antioxidante de determinação do poder de redução do íon ferro, FRAP (do inglês *Ferric Reducing Antioxidant Power*) é um procedimento simples e barato que mede os

níveis de antioxidantes totais em uma amostra. Este método está baseado na produção do íon Fe^{2+} (forma ferrosa) a partir da redução do íon Fe^{3+} (forma férrica) presente no complexo 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) (Figura 10). Quando a redução ocorre, há uma alteração na tonalidade da mistura de reação, passando de roxo claro a um roxo intenso, cuja absorbância pode ser medida no comprimento de onda de 600 nm (ANTOLOVICH et al., 2002; BENZIE; STRAIN, 1996). A alteração na absorbância a 600 nm (HALVORSEN et al., 2002) pode então ser comparada com um padrão para determinar o potencial antioxidante em uma determinada amostra. Este método tem sido utilizado para avaliar o potencial antioxidante em farelo de arroz (PHONGTHAI et al., 2018), resíduo de arroz (YAN et al., 2015) e linhaça (KARAMAC; KOSINSKA-CAGNAZZO; KULCZYK, 2016; SILVA et al., 2017).

Figura 10 - Reação química que descreve a produção de Fe^{2+} (forma ferrosa) a partir da redução de Fe^{3+} (forma férrica) presente no complexo com TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina)



Fonte: URREA-VICTORIA et al. (2016)

3.9.1.2 Aplicação dos peptídeos em alimento para verificar atividade antioxidante

Um dos principais problemas enfrentados pelas indústrias de alimentos diz respeito à manutenção da qualidade físico-química e microbiológica dos produtos fabricados por um longo período de tempo. Esta durabilidade pode ser alcançada com o uso de conservantes e também de antioxidantes, que garantem uma maior vida de prateleira e consequentemente um aumento nos lucros e redução de desperdício de alimentos, visto que esta é uma prática rotineira.

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), os principais conservantes utilizados pela indústria de alimentos atualmente incluem: o ácido benzóico e sais obtidos a partir dele, o sórbico e derivados, ácido propiônico e seus sais, dióxido de enxofre e derivados, nitritos, nitratos, ácido acético e acetatos, parabenos, ácido láctico e seus sais, nisina e natamicina. No entanto, todos estes são produzidos artificialmente e quando colocados de forma exagerada podem gerar complicações à saúde dos consumidores, como retrata Polônio e

Peres (2009): inúmeros aditivos tem provocados ações adversas que podem ser observadas ao longo prazo, sendo elas de forma aguda, através de reações tóxicas no organismo desencadeando alergias, vômitos, diarreias, ou seja, toxinfecções alimentares diversas ou crônica, levando a carcinogenicidade.

Com objetivos semelhantes, os antioxidantes têm sido utilizados cada vez mais pela indústria alimentícia, sendo considerados como compostos químicos capazes de retardar ou inibir a degradação oxidativa e ampliar a durabilidade dos produtos alimentícios. A legislação brasileira tem permitido a adição de até 1% das seguintes substâncias: BHA (butil hidroxianisol), BHT (butil hidrotolueno), PG (galato de propila) e TBHQ (t-butil hidroquinona). No entanto, o uso de antioxidantes sintéticos foi colocado em regulação rigorosa devido aos seus potenciais riscos para a saúde associados com uso a longo prazo (NDHLALA; MOYO; VAN STADEN, 2010).

A peroxidação lipídica constitui a principal causa de deterioração dos ácidos graxos (lipídios e matérias graxas) sendo assim, a inibição da peroxidação lipídica constitui uma das atividades bastante desejada dos antioxidantes. Devido a abundância nas células e susceptibilidade à oxidação pela presença de grupos metilênicos entre duplas ligações, os ácidos graxos poliinsaturados representam importantes alvos para os oxidantes (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999). A peroxidação lipídica inicia-se pelo ataque à bicamada lipídica por qualquer espécie suficientemente reativa para abstrair um átomo de hidrogênio bis-alílico de um ácido graxo poliinsaturado. Após ser iniciado, o processo torna-se autocatalítico e somente termina quando se esgotarem as reservas de ácidos graxos insaturados e oxigênio. Os principais produtos finais da lipoxidação compreendem álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres e outros hidrocarbonetos derivados da decomposição de hidroperóxidos.

O processo da peroxidação lipídica pode ser dividido em três etapas: iniciação, propagação e terminação. A fase de iniciação representa o início da peroxidação, em que os ácidos graxos poliinsaturados sofrem ataque de uma espécie que é suficientemente reativa para abstrair um átomo de hidrogênio a partir de um grupo metileno ($-\text{CH}_2-$), formando um radical de carbono. Esse radical é estabilizado por um rearranjo molecular para formar um dieno conjugado, ou seja, duas duplas ligações intercaladas por uma ligação simples. Em meio aeróbio, o radical alquila inicialmente formado se combina com o oxigênio formando o radical peroxila, o qual pode abstrair um hidrogênio alílico de um outro ácido graxo, gerando outro radical carbono e promovendo a etapa de propagação. A reação peroxila com o átomo de hidrogênio abstraído gera um hidroperóxido lipídico. Peróxidos cíclicos também podem ser formados, quando o radical peroxila reage com uma dupla ligação na mesma cadeia de ácido

graxo, o que também pode propagar a peroxidação lipídica. A terceira etapa, a terminação, dá-se pela aniquilação dos radicais formados originando produtos não radicalares. Os radicais peroxila e alcoxila também podem sofrer dismutação ou clivagem formando aldeídos; formar uma ligação covalente com resíduos de aminoácidos ou sofrer um rearranjo formando produtos secundários da peroxidação lipídica. A velocidade do processo é limitada pelas fases de iniciação e propagação (LIMA; ABDALLA, 2001).

Muitos métodos são descritos na literatura para avaliação da peroxidação lipídica, como a determinação de espécies reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), que foi desenvolvido no final da década de 40 e é comumente usados para testes tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Trata-se de um teste baseado na reação do ácido tiobarbitúrico com os produtos de decomposição dos hidroperóxidos. Um dos principais produtos formados no processo oxidativo é o malonaldeído, um aldeído com 3 átomos de carbono. Neste teste uma molécula de malonaldeído reage com duas moléculas de TBA para formar um complexo de cor vermelha, o qual absorve a 532-535 nm. A reação ocorre em meio ácido (pH 1-2) e a alta temperatura (100 °C), no sentido de aumentar a sua velocidade e sensibilidade (DOS SANTOS et al., 2007; SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

A oxidação lipídica é um processo chave que ocorre nos produtos à base de carne, o que também é uma das principais causas da deterioração da qualidade dos alimentos durante o armazenamento desses produtos. As tendências modernas em relação aos alimentos de conveniência resultaram no aumento da produção de produtos de carne pré-cozidos e reestruturados. No entanto, esses produtos são bastante suscetíveis à oxidação lipídica e ao desenvolvimento de sabor a ranço. Além da deterioração microbiana, a oxidação lipídica é o processo primário que causa perda de qualidade de alimentos (BUCKLEY; MORRISSEY; GRAY, 1995). Contudo, existem poucos trabalhos publicados sobre a inibição da oxidação lipídica em carne cozida. Zhou, Sun e Canning (2012) verificaram que os hidrolisados de proteínas de milho preparados a partir de proteases microbianas podem efetivamente inibir a oxidação lipídica em modelos alimentares. Kumar et al. (2016a) sugeriram que o hidrolisado de caseína de leite de camelo poderia ser um ingrediente alimentar potencial que não só melhora as propriedades físico-químicas da emulsão de carne, aumentando assim o rendimento, também proporciona estabilidade oxidativa e microbiana durante o armazenamento refrigerado. Assim, hidrolisados proteicos podem ser utilizados como antioxidantes naturais para melhorar a vida útil de produtos alimentares ricos em lipídios.

3.9.1.3 Modelo biológico para avaliação da capacidade antioxidante

Embora os testes químicos sejam relativamente simples para avaliação da capacidade antioxidante, verificou-se que estes não são representativos das condições celulares do homem. Por outro lado, os ensaios microbianos, utilizando-se principalmente células eucarióticas, têm-se mostrado muito adequados na determinação da capacidade antioxidante, constituindo-se em testes rápidos, sensíveis, econômicos e reprodutíveis (RABELLO-GAY; RODRIGUES, MONTELEONE-NETO, 1991).

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. Já os ensaios realizados com micro-organismos são fáceis, rápidos e podem utilizar um grande número de células com as mesmas características genéticas. Várias razões tornaram a levedura *Saccharomyces cerevisiae* um dos melhores modelos de sistema eucariótico unicelular para estudos de estresse oxidativo. Seu metabolismo é semelhante ao de eucariotos superiores, com mecanismos próprios de ativação metabólica (citocromo P450) e de detoxificação, que não estão presentes em bactérias. 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 (SOARES; ANDREAZZA; SALVADOR, 2003).

Por pertencer ao grupo das leveduras anaeróbicas facultativas, a *S. cerevisiae* é capaz de fermentar hexoses como glicose e frutose em condições aeróbicas e anaeróbicas de crescimento, sendo a glicose a fonte preferencial de carbono utilizada. A *S. cerevisiae* apresenta um ciclo eucariótico típico, completo e bem definido. O crescimento apresenta fases distintas do ponto de vista metabólico e cinético. Após um breve período de adaptação em meio rico (YPD – 2% de glicose), chamado de fase lag, as células iniciam uma divisão celular a cada hora e meia (fase exponencial), com energia proveniente da fermentação da glicose. Ao diminuir a disponibilidade de glicose no meio, ocorre a desrepressão catabólica (transição diáuxica), na qual há uma parada transiente na divisão celular, enquanto as células são preparadas para o metabolismo respiratório. Após, ela reassume a divisão celular em um ritmo mais lento (uma divisão a cada três ou quatro horas), utilizando o etanol como fonte de carbono produzido durante a fermentação (fase pós-diáuxica). Quando todas as fontes de carbono forem exauridas, as células entram na fase estacionária na qual podem sobreviver por muito tempo na ausência de nutrientes (FUGE; WERNER-WASHBURNE, 1997; PRINGLE; HARTWELL, 1982).

S. cerevisiae tem sido amplamente estudada, tornando-se ferramenta importante nas pesquisas em razão da sua notável semelhança às células de mamíferos no que se refere às macromoléculas, organelas e um grande número de proteínas com alta homologia com proteínas humanas. Esse organismo é utilizado em pesquisas sobre mutagênese, reparo de DNA e mecanismos que respondem ao estresse oxidativo (COSTA; MORADAS-FERREIRA, 2001). Algumas das propriedades que tornam a levedura particularmente apropriada para estudos biológicos incluem o seu rápido crescimento, segurança, possuir um sistema genético bem definido e mais significativamente, o conhecimento da sequência completa do seu genoma. *S. cerevisiae* foi o primeiro organismo eucarioto a possuir o genoma completamente sequenciado e depositado em bancos de dados especializados, permitindo a clonagem de diferentes genes, sua rápida identificação e caracterização, assim como melhor compreensão da sua função celular (JONES et al., 2008; PEÑA-CASTILLO; HUGHES, 2007).

A utilização de *S. cerevisiae* como um sistema modelo para o estudo da resposta ao estresse oxidativo, demonstra ser bastante útil para avaliar se um produto químico apresenta capacidade antioxidante ou pró-oxidante, já que suas defesas antioxidantes são semelhantes aos de organismos superiores (FRASSINETTI et al., 2012). Danos oxidativos a proteínas, lipídios, ácidos nucleicos e ao sistema de defesa contra o estresse oxidativo são basicamente semelhante em todos os níveis de organização celular, o que torna *S. cerevisiae* um organismo de referência para avaliação antioxidante *in vivo* (ROEHRS et al., 2010). 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, como por exemplo, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (BARONI et al., 2012; DI PAOLA NARANJO et al., 2016). Muitos estudos de resposta ao estresse oxidativo em *S. cerevisiae* têm sido realizados com células na fase logarítmica (ou exponencial) e não na fase estacionária onde as células leveduriformes se assemelham a células de organismos multicelulares em aspectos importantes: (i) maior parte da energia vem da respiração mitocondrial; (ii) as células estão na fase G_0 e (iii) o dano gerado é acumulado durante todo o tempo (LONGO; GRALLA; VALENTINE, 1996).

S. cerevisiae apresenta uma variedade de mecanismos de defesas antioxidantes, incluindo sistemas de defesas enzimáticas e não-enzimáticas. Um elaborado mecanismo enzimático constituído de superóxido dismutases, redutases, catalases, peroxidoredoxinas, glutarredoxinas e glutathione transferases é utilizado para manter o balanço redox nesse organismo (HERRERO et al., 2008). Como a maioria dos outros eucariotos, a *S. cerevisiae* possui duas superóxido dismutases (SOD) intracelulares, a CuZn-SOD (produto do gene *SOD1*) localizada no citoplasma, núcleo e lisossomas e a Mn-SOD (produto do gene *SOD2*) na matriz

mitocondrial (JAMIESON, 1998). A CuZn-SOD parece ser a enzima majoritária envolvida na remoção de ânions superóxido do citoplasma e também dos peroxissomos. Linhagens deficientes em CuZn-SOD apresentam problemas de crescimento em condições aeróbicas, são muito sensíveis a hiperóxia (excesso de oxigênio) e a substâncias envolvidas em reações tipo ciclo-redox, tais como paraquat e menadiona (SRINIVASAN et al., 2000). O papel fisiológico da Mn-SOD parece ser proteger a mitocôndria dos superóxidos gerados durante a respiração, tendo pouca participação no combate a superóxidos gerados por compostos redox-cíclicos. Linhagens deficientes em Mn-SOD são hipersensíveis ao oxigênio e crescem mal ou não crescem em fontes de carbono não-fermentáveis (JAMIESON; RIVERS; STEPHEN, 1994).

A levedura *S. cerevisiae* possui dois tipos de catalases denominadas catalase A e catalase T codificadas pelos genes *CTA1* e *CTT1*, respectivamente. A catalase A está localizada nos peroxissomos e o principal papel fisiológico dessa enzima é remover o H_2O_2 produzido pela β -oxidação de ácidos graxos. Já a catalase T está localizada no citoplasma e seu papel fisiológico ainda não é muito claro, uma vez que linhagens deficientes nessa enzima não apresentam defeitos no crescimento nem sensibilidade aumentada a peróxidos (JAMIESON, 1998)

Existem três tipos de glutathione peroxidase em levedura denominadas *GPx1*, *GPx2* e *GPx3*. Linhagens deficientes em *GPx3* são hipersensíveis a peróxidos, enquanto que linhagens deficientes em *GPx1* e *GPx2* não apresentam sensibilidade. Entretanto em condições de estresse gerado por substâncias endógenas como o paraquat, menadiona e H_2O_2 não há a indução da expressão do gene *GPx3*. A indução do gene *GPx1* ocorre quando há restrição de glicose enquanto que o gene *GPx2* é induzido em condições de estresse oxidativo

(INOUE et al., 1999). Leveduras possuem também tioredoxina peroxidase e tioredoxina redutase que atuam na redução de H_2O_2 , hidroperóxidos de alquila e agentes que contêm grupos tióis como o mercaptoetanol. Outra importante enzima dentro do mecanismo enzimático antioxidante da *S. cerevisiae* é a glutathione redutase. Essa enzima é responsável pela manutenção da elevada razão glutathione reduzida (GSH)/glutathione dissulfeto (GSSH) através da redução da glutathione oxidada (JAMIESON, 1998). As linhagens de *S. cerevisiae* deficientes em glutathione redutase, embora viáveis, acumulam um excesso de glutathione oxidada e são hipersensíveis a oxidantes (GRANT et al., 1996).

Talvez o exemplo mais conhecido de defesa antioxidante não-enzimática seja a GSH. Além disso, em condições de restrição alimentar a GSH também pode ser utilizada como fonte de nitrogênio e enxofre pela levedura (MEHDI; PENNINCKX, 1997). Outras moléculas envolvidas na proteção contra o estresse oxidativo em *S. cerevisiae* são: trealose, metalotioneína, tioredoxina e glutarredoxina.

Um tratamento prévio com um antioxidante aumentaria a tolerância celular ao estresse oxidativo. O H_2O_2 é difusível dentro e entre células *in vivo*, causando danos nas membranas, organelas e também no núcleo celular (WILMSEN; SANTA SPADA; SALVADOR, 2005). Atualmente, ainda não há pesquisas utilizando a levedura *S. cerevisiae* como modelo biológico para verificação da atividade antioxidante *in vivo* em hidrolisados proteicos. Di Paola Naranjo et al. (2016) verificaram em extrato de tomate que as células de levedura apresentaram sensibilidade ao peróxido (0,75 mM) e apenas 52% da população de leveduras puderam sobreviver ao estresse oxidativo. Stinco et al. (2015) obtiveram um aumento nas taxas de sobrevivência entre 23% e 38% em suco de laranja. Baroni et al. (2012) mediram a atividade antioxidante *in vivo* usando o modelo de *S. cerevisiae* exposto ao H_2O_2 para induzir o estresse oxidativo e, as três variedades de vinho apresentaram atividade antioxidante significativa.

3.9.2. Atividade antibacteriana

A contaminação microbiana é um dos principais problemas que podem afetar a vida útil dos alimentos e também podem causar doenças ao consumidor. Portanto, muitos produtos sintéticos são usados como conservantes para aumentar a segurança e a vida útil dos produtos alimentares. Como resultado se tem o aumento da consciência do consumidor sobre os efeitos deletérios de conservantes químicos e a crescente preferência por componentes naturais. Os pesquisadores se concentraram na geração de aditivos que demonstram significância antimicrobiana para serem usados na indústria alimentar (OSMAN; MAHGOUB; SITOHY, 2013). Os fatores críticos que afetam a atividade antibacteriana e os modos de ação dos peptídeos antimicrobianos são tamanho, carga, conformação/estrutura secundária, hidrofobicidade e origem (animal/vegetal ou marinha) (ANEIROS; GARATEIX, 2004).

As doenças veiculadas por alimentos são extremamente comuns no mundo. Estas doenças são de grande importância para a Saúde Pública devido aos problemas e prejuízos que trazem para a saúde da população humana. As incidências destas doenças vêm aumentando consideravelmente, devido a vários fatores que incluem as mudanças no estilo de vida da população, com a preferência por alimentos frescos, naturais, prontos e semi-prontos (CAPUANO et al., 2008), além do crescente aumento das populações; a existência de grupos populacionais vulneráveis ou mais expostos; o processo de urbanização desordenado e a necessidade de produção de alimentos em grande escala. Contribui, ainda, para o deficiente controle dos órgãos públicos e privados no tocante à qualidade dos alimentos ofertados às populações (BRASIL, 2010). *Staphylococcus aureus* é considerado um dos potenciais

veiculadores de doenças por meio de alimentos e água contaminados. *E. coli* O157:H7 é reconhecida como patógeno de origem alimentar desde 1982, respondendo por milhares de casos de diarreia e síndrome urêmica hemolítica nos Estados Unidos, Europa e Japão.

As bactérias do gênero *Staphylococcus* se caracterizam por serem cocos Gram positivos, com aproximadamente 1 micrômetro de diâmetro, tendem a formar agrupamentos em arranjos semelhantes a cachos de uva, são anaeróbicas, imóveis, não possuem a capacidade de formar esporos e são catalase positiva. Este gênero possui espécies presentes na microbiota normal de seres humanos, podendo estar presente na pele e mucosas como comensais e também podem atuar como patógenos oportunistas, causando infecções piogênicas, tendo a espécie *Staphylococcus aureus* como o principal agente etiológico deste gênero (QUINN et al., 2007). O *S. aureus* pode produzir doenças a nível sistêmico, incluindo infecções da pele, tecidos moles, ossos e no trato urinário (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014), podendo ainda se multiplicar nos alimentos e produzir toxinas que podem levar ao quadro de intoxicação estafilocócica.

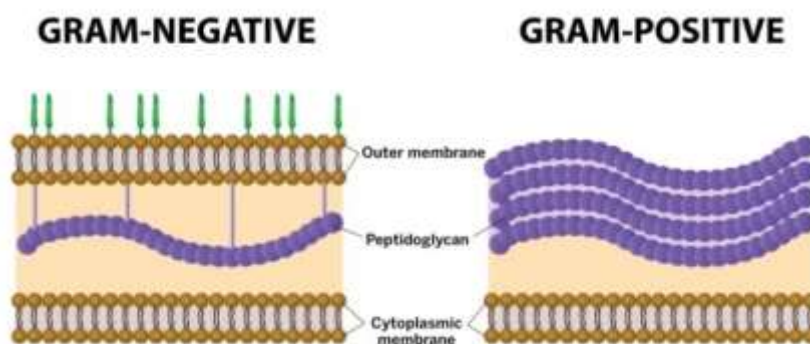
Escherichia coli é uma bactéria Gram-negativa da família *Enterobacteriaceae* que faz parte da microbiota intestinal normal do ser humano e dos animais. No entanto, algumas cepas desta espécie são patogênicas e associadas a uma grande variedade de infecções intestinais e extra-intestinais (NATARO; KAPER, 2011). *E. coli* O157:H7 como agente de doenças transmitidas por alimentos, tem sido especialmente associada ao consumo de alimentos de origem animal como carnes, leites e produtos derivados (MECHIE; CHAMPMAN; SIDDONS, 1997), uma vez que rebanhos bovinos leiteiros e de corte são os principais reservatórios para infecção humana por *E. coli* O157 (GRIFFIN; TAUXE, 1991).

A camada externa das bactérias Gram negativas é composta por uma bicamada lipídica constituída por lipopolissacarídeos (LPS), logo apresenta caráter apolar restringindo assim a passagem para o interior da célula de componentes também apolares. Já as bactérias Gram positivas possuem em sua parede celular moléculas de ácido lipoteicoico, com extremidades lipofílicas que facilitariam a infiltração de compostos hidrofóbicos (COX et al., 2000). Os peptídeos antimicrobianos, na sua maioria, interagem com a superfície da membrana das células bacterianas, causando a destruição da integridade estrutural da membrana, além disso, alguns peptídeos podem atuar em alvos no interior do citoplasma bacteriano (BECHINGER; LOHNER, 2006). O efeito antimicrobiano dos peptídeos antimicrobianos está relacionado com a capacidade dos compostos em interagir com as membranas bacterianas, inibindo o crescimento dos microrganismos através do rompimento das membranas, interferência no

metabolismo ou ataque aos componentes celulares (TRAVKOVA; MOEHWALD; BREZESINSKI, 2017).

Comparando as bactérias, as Gram negativas seriam mais resistentes em função de sua membrana externa, que é mais complexa e rígida, enquanto a espessa camada de peptidoglicano das bactérias Gram positivas não seria suficientemente densa, para impedir a passagem de pequenas moléculas antimicrobianas, como apresenta a Figura 11 (RAI et al., 2017).

Figura 11 - Apresentação das diferenças entre as paredes celulares de bactérias Gram positivas e Gram negativas



Fonte: COX et al. (2000)

Diferentes modelos são propostos para explicar como os peptídeos se inserem na bicamada lipídica da membrana bacteriana, resultando na alteração da permeabilidade da membrana (JENSSEN; HAMILL; HANCOCK, 2006). Pesquisas realizadas nos últimos 20 anos conseguiram identificar e isolar cerca de 1.200 peptídeos antimicrobianos, com sequências de aminoácidos variados, mas com características comuns, como por exemplo, os peptídeos antimicrobianos em geral, são catiônicos, apresentam carga molecular positiva, devido à grande quantidade de resíduos de lisina, arginina e histidina e são hidrofóbicos ou anfipáticos (NAKATSUJI; GALLO, 2012). Resíduos hidrofóbicos, como triptofano e valina podem perfazer de 30 a 50% das estruturas dos peptídeos antimicrobianos, e desempenham um papel vital na interação com a membrana das bactérias (HUANG, 2000; ZHANG et al., 2016). Além disso, os peptídeos antimicrobianos são atraídos pela superfície aniônica das membranas bacterianas, e após a interação, os peptídeos sofrem mudanças conformacionais, causando uma perturbação na estrutura da bicamada lipídica (ZASLOFF, 2002).

Na literatura, há poucos estudos da atividade antibacteriana de hidrolisados provenientes de produtos vegetais. Kobbi et al. (2015) identificaram doze peptídeos da proteína Rubisco (enzima mais abundante nas plantas), três novos peptídeos antibacterianos puros,

nomeadamente Metionina-Ácido aspártico-Asparagina, Ácido glutâmico-Leucina-Alanina-Alanina-Alanina-Cisteína e Leucina-Arginina-Ácido aspártico-Ácido aspártico-Fenilalanina avaliados contra Gram negativas (*Escherichia coli* e *Salmonella enterica*) e Gram positivas (*Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus* e *Bacillus subtilis*). Salami et al. (2010) relataram que a hidrólise limitada de proteínas de soro de camelo por quimiotripsina, proteinase K, tripsina e termolisina aumentaram suas atividades antibacterianas contra *E. coli*, no entanto, uma hidrólise limitada por tripsina ou quimiotripsina não aumentou a sua atividade antibacteriana. Para Abdel-Hamid et al. (2016) o soro de camelo hidrolisado com papaína exibiu significativamente maior atividade antibacteriana do que o soro de camelo não-hidrolisado. Hwang et al. (2016) estudaram a atividade antibacteriana de hidrolisados de proteína de linhaça por protease bruta da estirpe *Bacillus altitudinis* HK02 e a fração de baixa massa molecular (< 1 kDa) de peptídeos apresentou o melhor resultado para a inibição do crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*.

3.9.2.1. Métodos de análise de atividade antibacteriana

Os métodos de análise mais utilizados para determinar a atividade antibacteriana normalmente classificam-se como difusão ou diluição (BURT, 2004), sendo realizados em ágar ou caldo, respectivamente.

i. Disco difusão

A técnica de difusão em disco é adaptada de protocolos internacionais originalmente concebidos para análise de antibióticos (CLSI, 2015). Inicialmente o teste de difusão em disco é utilizado para determinar o espectro de ação das bactérias (BURT, 2004), identificando quais bactérias são sensíveis e, para quais, são válidos estudos mais detalhados.

Basicamente, culturas novas (24h de cultivo) de bactérias a serem testadas são suspensas em um diluente (normalmente água salina ou peptonada), para obter a concentração celular de 10^8 UFC mL⁻¹, utilizando como parâmetro para as suspensões bacterianas os padrões de *McFarland* ou, avaliando a concentração através da densidade ótica em espectrofotômetro ($\lambda = 625$ nm). Essa suspensão celular é inoculada na superfície de placas com ágar (normalmente ágar Muller & Hilton ou ágar *Brain Heart Infusion*) com o auxílio de *swabs* estéreis. Após secar o inóculo, são dispostos discos de papel filtro estéreis (geralmente com 6 mm de diâmetro)

sobre a superfície do ágar, nos quais é aplicado a amostra que se deseja testar (na maioria das vezes 10 µL).

Após um período de repouso, para que a amostra se difunda no meio, o sistema é incubado nas condições de tempo e temperatura ideais para a bactéria avaliada (37 °C / 24 h na grande maioria). Após a incubação, é verificada a existência de halos de inibição ao redor dos discos, os quais indicam a sensibilidade da bactéria à amostra testada. Esses halos podem ser quantificados e expressos em função do seu diâmetro, no entanto, servem apenas para comparação entre diferentes amostras, já que muitos fatores podem afetar o tamanho do halo obtido, não sendo viável a comparação entre diferentes trabalhos ou mesmo diferentes bactérias. De um modo geral, a análise de disco difusão é útil para uma verificação preliminar da atividade antibacteriana antes de estudos mais detalhados (BURT, 2004).

ii. Concentração mínima inibitória

A atividade antimicrobiana de um agente pode ser medida determinando-se a menor quantidade desse agente necessária para inibir o crescimento de um micro-organismo teste, sendo esta quantidade denominada concentração mínima inibitória (CMI). A CMI não é constante para um determinado agente antimicrobiano, uma vez que pode ser afetada pela natureza do micro-organismo-teste utilizado, tamanho do inóculo, composição do meio de cultura, tempo e condições de incubação, tais como temperatura, pH e aeração (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2003). Quando todas as condições são padronizadas, é possível comparar diferentes agentes antimicrobianos, determinando-se qual o mais eficaz contra um determinado micro-organismo, ou realizar a avaliação da atividade de um único agente contra uma variedade de micro-organismos.

iii. Concentração mínima bactericida

A concentração mínima bactericida (CMB) representa a concentração mínima capaz de reduzir 99,9% do inóculo bacteriano inicial (CLSI, 2003; LORIAN, 2005). Após a determinação da CMI, alíquotas de todas as diluições onde não houve multiplicação celular são plaqueadas em ágar. O propósito de semear amostras dessas diluições é verificar em quais delas as células bacterianas foram apenas inibidas (efeito bacteriostático), situação na qual haverá multiplicação em um novo meio de cultivo sem o antimicrobiano e, em quais diluições as

células bacterianas foram realmente mortas, onde não haverá crescimento mesmo após inoculação em um novo meio sem o antimicrobiano.

3.9.3. Atividade hipocolesterolêmica

A hiperlipidemia é um distúrbio metabólico que decorre do aumento da concentração de lipídios plasmáticos e alterações no seu metabolismo. Clinicamente, as hiperlipidemias podem manifestar-se como hipercolesterolemias e/ou hipertrigliceridemias. O excesso de lipídios é resultado do acúmulo de uma ou mais classes de lipoproteínas devido à menor remoção do plasma, maior produção ou associação de ambas. Estas anormalidades podem ser primárias ou secundárias a outras doenças ou uso de certos medicamentos (SANTOS, 2001).

Doenças cardiovasculares como aterosclerose, doença arterial coronariana, acidente vascular cerebral e insuficiência cardíaca, são uma grande preocupação com a saúde, porque são uma das principais causas de morte na maioria dos países industrializados. Um dos principais fatores de risco é a hipertensão, definida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como o excedente de 90 mm Hg para a pressão arterial diastólica e 140 mm Hg para a pressão sistólica. Atualmente, a Federação Mundial do Coração (*World Heart Federation*) (WHT, 2018) prevê uma redução de 25% em 2025 em mortes prematuras por doenças cardiovasculares no mundo.

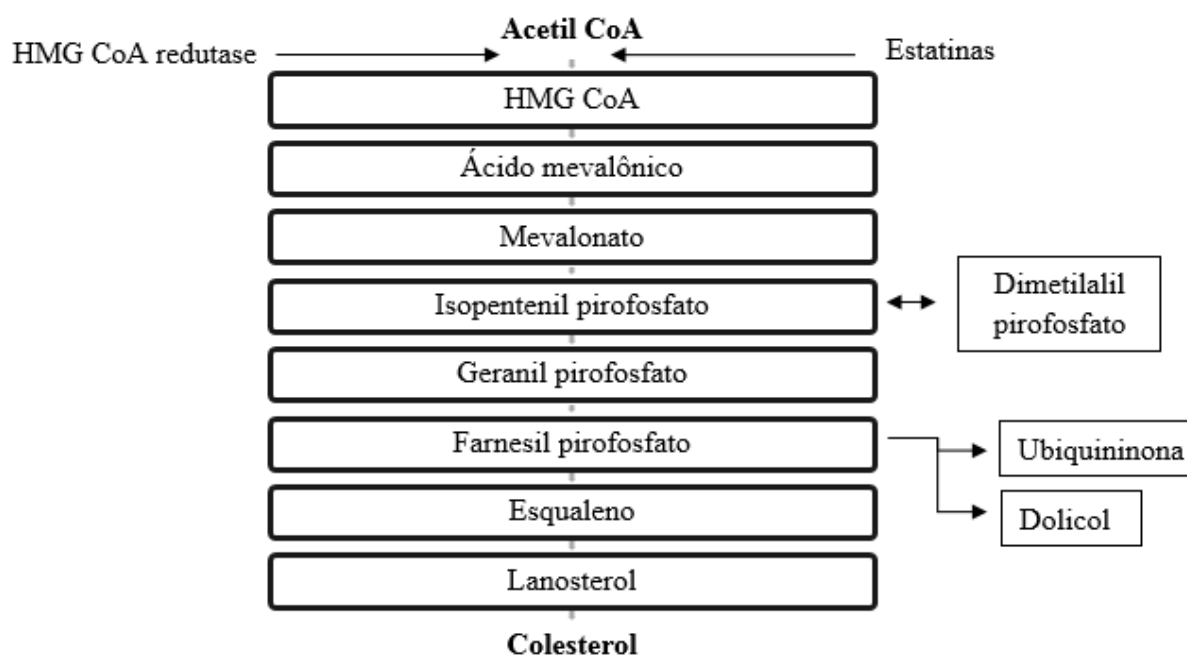
A maior parte do colesterol circulante é sintetizada no próprio organismo (70%) a partir de ácidos graxos, sendo que o colesterol proveniente da dieta (30%) tem menor participação (BRODY, 1998; STIPANUK, 2000). A enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (HMG-CoA redutase) é um passo determinante na velocidade de produção de colesterol hepático. Por esta razão, essa enzima é o alvo de várias drogas visando o controle dos níveis de colesterol. A atividade hipocolesterolêmica ainda não foi estudada para as proteínas de chia, porém segundo SIERRA et al. (2015) o seu óleo pode proteger a função vascular contra os efeitos deletérios do início da hipercolesterolemia em coelhos.

O fígado é o órgão mais importante na manutenção da homeostase do colesterol, sendo responsável pela excreção do mesmo via bile (SPADY; DIETSCHY, 1985). Na absorção entérica do colesterol, o organismo promove uma emulsificação prévia, formando micelas mistas de sais biliares e lipídios, além de contar com mecanismos passivos baseados no equilíbrio relativamente rápido entre o colesterol e os conjuntos hidrofóbicos dos constituintes micelares (CORETA-GOMES et al., 2012). Em células animais, potencialmente todos os tecidos possuem a capacidade de produzir colesterol, como o intestino, os tecidos reprodutivos,

o córtex adrenal, mas a produção majoritária se encontra no fígado e é denominada síntese de novo de colesterol pela via do mevalonato (COSKUN; SERTESER; UNSAL, 2013), como apresentado na Figura 12.

O passo limitante da velocidade da via do mevalonato é a conversão de 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) em mevalonato catalisada pela 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (HMG-CoA redutase). Essa via é regulada pela retroalimentação quando há ingestão dietética de colesterol e, em consequência disso, também pelos receptores de absorção plasmática de lipoproteína de baixa densidade (LDL). Quando esses dois componentes estão elevados, a HMG-CoA redutase é inibida e a formação de mevalonato é interrompida. Complementarmente, o colesterol em excesso é desviado para a produção de outros derivados como ácidos biliares, vitamina D, hormônios esteróides, com o intuito de manter a homeostase (IKONEN, 2008). As drogas, como as estatinas, inibem a biossíntese de colesterol mediante o controle enzimático, inibindo a HMG-CoA redutase por ligação ao local ativo da enzima, evitando a ligação do substrato, auxiliando na diminuição dos níveis de colesterol no sangue, proteção contra a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade, bem como efeitos anti-inflamatórios e redução no nível de proteína C reativa (COSKUN; SERTESER; UNSAL, 2013; ISTVAN; DEISENHOFER, 2001).

Figura 12 - Representação da biossíntese de colesterol



Fonte: Adaptado de MATHEW et al. (2011)

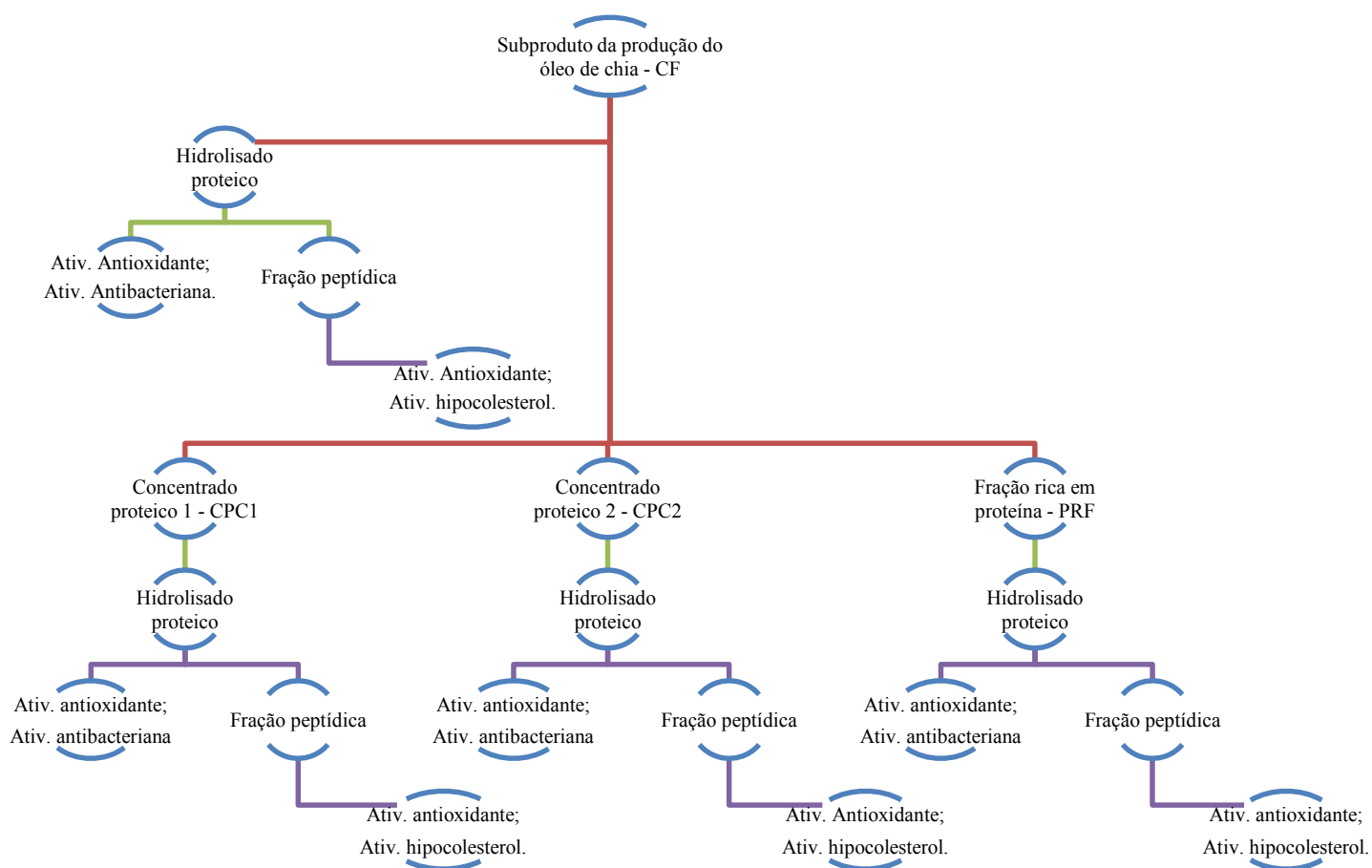
A ação de proteínas vegetais isoladas vem sendo investigada por diversos autores, e como resultado, observa-se redução plasmática de colesterol em ratos, hamsters, coelhos e humanos por meio de intervenção nutricional (AYERZA; COATES, 2000; FROTA et al., 2015; YANG et al., 2013; YOON et al., 2013). Marques et al. (2015) reduziram em 89% a velocidade de reação enzimática da enzima HMG-CoA redutase com peptídeos de isolado proteico de feijão cru, de massa molecular inferior a 3 kDa, submetidos a digestão humana simulada. Soares et al. (2015) identificaram as sequências Glicina-Glicina-Valina, Isoleucina-Valina-Glicina e Valina-Glicina-Valina-Leucina, inibiram significativamente a atividade da HMG-CoA redutase, sugerindo um possível efeito hipocolesterolêmico.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

A Figura 13 apresenta o fluxograma experimental da tese, apresentando os passos do desenvolvimento do projeto.

Figura 13 - Fluxograma do desenvolvimento do projeto de tese



4.2. MATÉRIA-PRIMA

O subproduto, a farinha de chia (*Salvia hispanica L.*) parcialmente desengordurada, foi fornecida pela empresa Cacália Produtos Naturais, localizada em Estância Velha, RS, Brasil e subdivididas em sacos de 1 Kg e armazenados sob refrigeração (4 °C).

4.3. ENZIMAS

As enzimas Alcalase 2.4 L FG, endopeptidase bacteriana produzida a partir do *Bacillus licheniformis*, e Flavourzyme 1000 MG, complexo de peptidase produzida por fermentação submersa de uma linhagem selecionada do fungo *Aspergillus oryzae*, foram fornecidas pela LNF Latino Americana, localizada em Bento Gonçalves, RS, Brasil.

4.4. MICRO-ORGANISMOS E LEVEDURA

A atividade antioxidante *in vivo* foi realizada utilizando células de *S. cerevisiae* BY4741 (Invitrogen™, código 95400.BY4741). Foram testados os efeitos antibacterianos dos hidrolisados sobre as cepas padrão das bactérias *Escherichia coli* O157:H7 (ATCC 43895) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 10832).

4.5. MÉTODOS

4.5.1 Determinação da atividade específica das enzimas

A atividade específica das enzimas Alcalase e Flavourzyme foi realizada pelo método descrito por Sigma (1999), 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 1). A atividade enzimática foi definida como μmol de tirosina livre $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína. A proteína da enzima foi quantificada pelo método de Lowry et al. (1951), utilizando a curva padrão de albumina (Apêndice 2).

4.5.2 Obtenção da fração rica em proteína

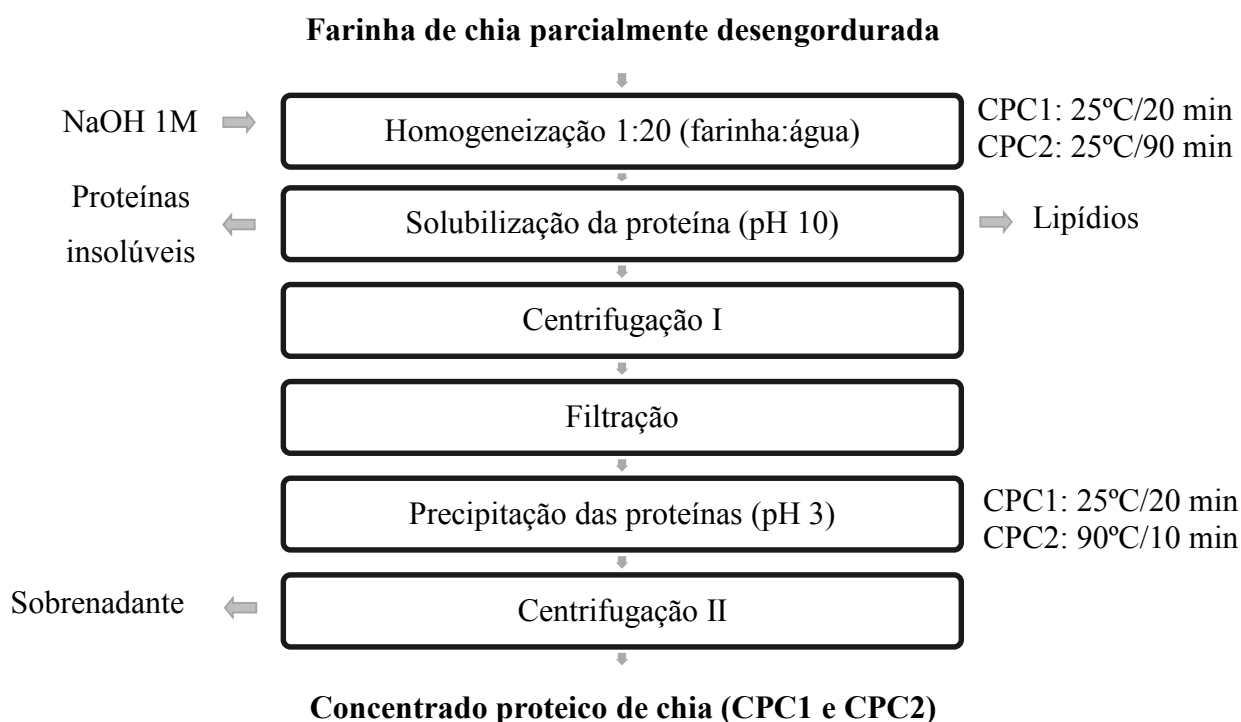
O subproduto da produção do óleo (farinha de chia parcialmente desengordurada - CF) foi triturado em moinho de facas equipado com malha de 0,5 mm. A fração rica em proteína (PRF) foi obtida pela passagem da farinha em peneiras de Tyler 100, onde a fração superior consiste principalmente de fibras (descartada) e a inferior principalmente de proteínas (PRF), de acordo com Vázquez-Ovando et al. (2010).

4.5.3 Obtenção dos concentrados proteicos

A curva de solubilidade foi realizada, do pH 2 ao 12, de acordo com Bera e Mukherjee (1989), encontrando-se valores de pH 10 e 3 de solubilização e precipitação, respectivamente (Apêndice 3). A proteína foi quantificada pelo método de Lowry et al. (1951), utilizando a curva padrão de albumina (Apêndice 4).

Os concentrados proteicos obtidos a partir do subproduto (CF) foram obtidos pelo método de pH *shifting* segundo Nolsøe e Undeland (2009) – CPC1 –, à temperatura ambiente, e segundo Ragab, Babiker e Eltinay (2004) – CPC2 –, à temperatura de 90 °C para a precipitação, com algumas modificações. A Figura 14 apresenta o fluxograma do processo de obtenção dos concentrados proteicos. Os concentrados proteicos obtidos foram liofilizados (LIOTOP, L108, Brasil), triturados em moinho de facas e peneirados em peneiras de Tyler 32.

Figura 14 - Fluxograma do processo de obtenção dos concentrados proteicos de chia



4.5.4 Caracterização da farinha parcialmente desengordurada, da fração rica em proteína e dos concentrados proteicos

Todas as análises foram realizadas nas amostras secas ou liofilizadas.

4.5.4.1 Composição proximal

O teor de umidade (método nº 935.29), cinzas (método nº 923.03), lipídios (método nº 920.85), proteínas (método de micro-Kjeldahl, nº 920.87) e fibras (método nº 962.09) foram determinados de acordo com a *Association of Official Analytical Chemists International* – (AOAC, 2000). O conteúdo de carboidratos foi obtido por diferença.

4.5.4.2 Cor

Os parâmetros de cor L^* (luminosidade), a^* e b^* (coordenadas de cromaticidade) foram medidos usando um colorímetro Minolta® modelo CR400. A Comissão Internacional de Iluminação (CIE) definiu esses parâmetros em 1976. Além disso, o índice de brancura (IB) foi calculado usando a equação $IB = L^* - 3b^*$ (MARCONE; KAKUDA, 1999).

4.5.4.3 Composição de aminoácidos

A composição de aminoácidos foi realizada no Centro de Química de Proteínas localizado no Departamento de Biologia Celular, Molecular e Bioagentes Patogênicos, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, na cidade de Ribeirão Preto, no Estado de São Paulo. Alíquotas de 10 mg foram transferidas para tubos Eppendorf e submetidas a hidrólise, pela adição de 600 µL de HCl 6 M e subsequentemente submetidas a 110 °C durante 24 h. Após a hidrólise, conforme as amostras foram ressuspensas em 5 mL de água ultrapura e filtradas em tubos de falcon utilizando o filtro Millipore (0,45 µm). O material foi liofilizado e ressuspenso em 1000 µL de fase móvel antes da injeção no cromatógrafo. Para essa determinação, foi utilizada uma coluna C18 Pico-Tag Waters com dimensões de 3.9x150 mm. A cromatografia foi desenvolvida à temperatura constante de $38,0 \pm 0,1$ °C no equipamento CM4000 do Laboratório de Controle de Dados (Milton Roy Co.), com sistema de bomba binária, espectrofotômetro com comprimento de onda fixo a 254 nm e 10 µL de célula de fluxo contínuo. Os teores de aminoácidos foram apresentados como mg por g de proteína.

4.5.4.4 Fracionamento das proteínas

A extração sequencial das albuminas, globulinas, prolaminas e glutelinas foram realizadas de acordo com Naozuka e Oliveira (2007). Para essa determinação, 10 mL de uma

solução metanol:clorofórmio (1:2 v v⁻¹) foram adicionados em 5 g de amostras, agitados a 200 rpm por 15 min. Este procedimento foi repetido duas vezes. Em seguida, as amostras foram submetidas ao procedimento de extração. As soluções extratoras utilizadas foram: (1) água destilada, (2) NaCl 0,5 mol L⁻¹, (3) etanol 70% (v v⁻¹) e (4) NaOH 0,5 mol L⁻¹. Em cada etapa, adicionou-se às amostras 10 mL de cada solução e manteve-se sob agitação mecânica por 30 min a 200 rpm. Após este tempo, as amostras foram centrifugadas por 10 min a 8667 xg e os sobrenadantes, de cada uma das frações, recuperados, avolumados para 10 mL e a proteína determinada pelo método de Lowry et al. (1951), utilizando a curva padrão de albumina (Apêndice 4).

4.5.4.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida

A massa molecular das proteínas foi determinada por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de acordo com Laemmli (1970). As amostras (0,4% [m/m] equivalente de proteína) foram dissolvidas em água destilada. As amostras solubilizadas foram misturadas a uma razão de 1:1 (v v⁻¹) com tampão de solubilização da amostra (Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 contendo 33% de glicerol, 10% de SDS e 25% de água destilada na presença de 3% [v/v] β-mercaptoetanol) e aqueceu-se num banho de água a ferver durante 30 min. As proteínas foram carregadas sobre um gel de poliacrilamida feito de gel de separação a 14% e gel de concentração a 4% e submetido a eletroforese a uma corrente constante de 40 mA. O gel foi corado de um dia para o outro com Coomassie Brilliant Blue R-250 (1%) e descorado usando um solução de 5% de metanol e 7,5% de ácido acético. O padrão aplicado foi BenchMark™ Protein Ladder, que consiste em 15 bandas de proteínas que variam em massa molecular de ~10-220 kDa, das quais as bandas de proteínas de 20 e 50 kDa são mais proeminentes para fácil orientação e identificação.

4.5.4.6 Calorimetria diferencial de varredura

As propriedades térmicas foram determinadas utilizando um calorímetro diferencial de varredura (DSC-60, Shimadzu, Japão). Aproximadamente 6 mg de amostra foram colocadas em placas de alumínio. O calorímetro foi calibrado usando padrão de índio (In), e uma placa vazia foi utilizada como referência. As placas foram seladas hermeticamente e aquecidas a uma velocidade de 10 °C min⁻¹ à faixa de temperatura de 30-180 °C sob atmosfera de N₂ a uma taxa de 50 mL min⁻¹. A temperatura de início (T₀), temperatura de transição ou desnaturação de

pico (T_d), a variação de entalpia (ΔH) foi avaliada a partir do pico dos termogramas DSC usando a Versão TA60WS (Shimadzu, Japão).

4.5.4.7 Espectroscopia de infravermelho

Os espectros de infravermelhos das amostras foram registrados usando um espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier (IR prestige-21, A210045, Shimadzu Corporation, Ltd, Japão) com pastilhas de KBr e resolução de 4 cm^{-1} . Os espectros foram obtidos na faixa de $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$, após 45 varreduras. As medições foram realizadas no modo de absorção, no qual o feixe infravermelho passou diretamente através das amostras.

4.5.4.8 Microscopia eletrônica de varredura

A morfologia de superfície foi avaliada utilizando um microscópio eletrônico de varredura (Jeol, JSM - 6610LV, Thermo Scientific, Ultra Dry, USA). As amostras foram depositadas diretamente em *stubs* de alumínio usando uma fita adesiva de carbono dupla face e revestidas com uma fina camada de ouro. Foi utilizado um potencial de aceleração de 15 kV.

4.5.5 Propriedades funcionais da farinha parcialmente desengordurada, da fração rica em proteína e dos concentrados proteicos

4.5.5.1 Menor concentração de gelificação

A menor concentração de gelificação (LGC) das proteínas foi realizada de acordo com Sathe, Deshpande e Salunkhe (1982) com algumas modificações. As proteínas de chia (2-18% m/m) foram preparadas em água destilada, agitadas durante 30 min à $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ utilizando um agitador magnético, arrefecida até à temperatura ambiente e armazenada a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante a noite. A LGC foi determinada visualmente como a concentração mínima de proteína na qual o gel não flui do tubo quando invertido.

4.5.5.2 Firmeza do gel

A firmeza das amostras de gel foi realizada utilizando um analisador de textura TA-XT2 (Stable Micro Systems, UK). Para isso, os géis de proteína foram preparados a uma

concentração de 25% (m/m) em água destilada. Subsequentemente, as suspensões foram agitadas durante 30 min a 90 °C utilizando um agitador magnético, arrefecidas até à temperatura ambiente e armazenadas a 4 °C durante a noite. Os géis resultantes foram cortados em pequenos cilindros de gel de 25 mm de diâmetro e 10 mm de altura. As peças de gel foram comprimidas a uma velocidade constante de 1,0 mm s⁻¹. Uma sonda cilíndrica com um diâmetro de 40 mm foi utilizada para este fim.

4.5.5.3 Solubilidade proteica

A solubilidade proteica foi determinada seguindo o método de Bera e Mukherjee (1989). As amostras (equivalente de proteína 1% [m/m]) foram dispersas em água destilada e o pH das soluções de amostra foi ajustado de 2 a 11 utilizando HCl 1 M ou NaOH 1 M. Após 30 min de agitação à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 8667 *xg* durante 15 min à temperatura ambiente (25 ± 2 °C). O conteúdo de proteína foi determinado nos sobrenadantes utilizando uma curva padrão de albumina (Apêndice 4). A solubilidade foi expressa como percentagem de proteínas que foram determinadas pelo método de Lowry et al. (1951).

4.5.5.4 Capacidade e estabilidade de espuma

A capacidade e a estabilidade de espuma foram estudadas de acordo com o método de Miller e Groninger (1976) com modificações. Para este método, as amostras foram preparadas por dissolução de cada amostra em água destilada (equivalente de proteína 1% [m/m], pH 2-11) usando um homogeneizador Ultra-Turrax (T25, IKA WERKE) a 10.000 rpm durante 1 minuto. Os volumes (150 mL) foram registrados antes e depois da homogeneização. A capacidade/estabilidade da espuma foi calculada usando a Eq. (2).

$$\text{Capacidade/Estabilidade(\%)} = \frac{(V_2 - V_1)}{V_1} * 100 \quad (2)$$

Onde V₂ (mL) são os volumes da suspensão mais a espuma e V₁ (mL) são os volumes iniciais da suspensão de proteína.

A estabilidade da espuma foi avaliada medindo o volume total após 20 min da formação de espuma.

4.5.5.5 Atividade e estabilidade emulsificante

A atividade emulsificante e a estabilidade da emulsão foram determinadas pelo método de Yasumatsu et al. (1972) com algumas modificações. As alíquotas (5 mL) de soluções de amostra (equivalente de proteína 10 mg mL⁻¹) ao seu valor de pH correspondente (2-11) foram misturadas com 5 mL de óleo de soja usando um homogeneizador Ultra-Turrax (T25, IKA WERKE) a 10.000 rpm durante 1 min. A altura da camada emulsionada e o teor total do tubo foram medidos após 24 h. A atividade emulsificante (AE) foi calculada (Eq. 3) como:

$$AE (\%) = \frac{\text{Altura da camada emulsionada no tubo}}{\text{Altura do conteúdo total no tubo}} * 100 \quad (3)$$

Para determinar os valores de estabilidade, a emulsão foi aquecida a 80 °C durante 30 min. A estabilidade da emulsão (EE) foi calculada (Eq. 4) como:

$$EE (\%) = \frac{\text{Altura da camada emulsionada após o aquecimento}}{\text{Altura da camada emulsionada antes do aquecimento}} * 100 \quad (4)$$

4.5.5.6 Capacidade de absorção de água e óleo

As capacidades de absorção de água e óleo foram determinadas de acordo com o método de Beuchat (1977). As amostras (equivalente de proteína 0,5 g) foram misturadas durante 30 min com 5 mL de água destilada ou 5 mL de óleo de soja refinado. A suspensão foi centrifugada a 8667 xg durante 10 min, e a água/óleo não absorvente foi decantada e pesada. O sobrenadante foi recuperado, e sua massa foi medida. Os valores de absorção de água e óleo foram calculados utilizando a Eq. (5) e expresso em massa (g) de água ou óleo por unidade de massa (g) de proteína.

$$\text{Capacidade de absorção de água e óleo} = \frac{W_o - W_s}{W_o} \quad (5)$$

Onde W_o são os valores de massa de água ou óleo usados (g) e W_s são a água recuperada no sobrenadante ou óleo não absorvido (g), respectivamente.

4.5.6 Hidrólise proteica

O subproduto (CF), a fração rica em proteína (PRF) e os concentrados proteicos (CPC1 e CPC2) foram hidrolisados em bateladas por tratamento com a Alcalase, Flavourzyme e sequencial Alcalase-Flavourzyme. A quantidade de 2 g de proteínas foi ressuspensa em 100 mL de água e hidrolisada por lotes em um reator, equipado com agitador, termômetro e eletrodo de pH de acordo com as condições apresentadas na Tabela 1. O pH 7 para a Alcalase foi determinado através de testes preliminares (Apêndice 5). As condições foram constantemente monitoradas e mantidas ao longo do processo. O pH (alterado como resultado da hidrólise) foi mantido constante pela adição de uma quantidade conhecida de NaOH 1 M padronizada. Em todos os tratamentos, a reação foi interrompida por aquecimento a 85 °C durante 15 min, seguido por centrifugação a 14,308 xg durante 20 min para remover a porção insolúvel (PEDROCHE et al., 2002). Os hidrolisados obtidos foram liofilizados (LIOTOP, L108).

Tabela 1 - Condições de hidrólise utilizadas para a preparação de hidrolisados de proteína de chia

Código	Enzima	Atividade específica (U mg ⁻¹)	Enzima/Proteína (U g ⁻¹)	T (°C)	pH	Tempo (min)
A	Alcalase	9	30	50	7	240
F	Flavourzyme	2.76	50	50	8	240
S	Alcalase +	9	30	50	7	60 + 180
	Flavourzyme	2.76	50	50	8	

Um U é definido como a caseína hidrolisada para produzir cor equivalente a 1 µmol de tirosina por minuto a um pH 7,5 e 37 °C.

O grau de hidrólise foi determinado pelo método de pH stat utilizando as Eq. (6), (7) e (8) (ADLER-NISSEN, 1986).

$$GH = \frac{V \cdot N_b}{\alpha \cdot h_{hot} \cdot M_p} * 100\% \quad (6)$$

$$\alpha = \frac{10^{pH-pK_a}}{1 + 10^{pH-pK_a}} \quad (7)$$

$$pka = 7,8 + \frac{298-T}{298} * 2400 \quad (8)$$

Onde: V corresponde ao volume de NaOH consumido durante a hidrólise para manter o pH constante (mL); N_b corresponde a normalidade de NaOH; α corresponde ao grau médio de dissociação dos grupos α-NH; M_p corresponde a massa de proteínas (g, determinado em N × fator de Kjeldahl), h_{tot} corresponde ao número total de ligações peptídicas no substrato proteico (utilizado o valor 8 para as proteínas de chia); pH corresponde ao valor em que a hidrólise enzimática foi realizada, pKa corresponde ao pKa médio de α-NH₃ e T a temperatura em °K.

4.5.7 Fracionamento dos peptídeos utilizando ultrafiltração

O fracionamento dos hidrolisados em diferentes frações peptídicas foi realizado mediante célula de ultrafiltração (Advantec, UHP-76, Japão) através de membranas de celulose com limite de massa molecular (MM). Os hidrolisados foram diluídos em água ultrapura e ultrafiltrados sequencialmente através de duas membranas com limite de massa molecular nominal de 3 e 10 kDalton (kDa) sob o gás nitrogênio de 60 psi para proporcionar três frações: retentado 1 (fração 1, F1, representa as frações peptídicas de tamanho molecular > 10 kDa), retentado 2 (fração 2, F2, representa as frações peptídicas de tamanho molecular entre 3 e 10 kDa) e permeado (fração 3, F3, representa as frações peptídicas de tamanho molecular < 3 kDa). Todos os retentados e permeados foram mantidos à temperatura de -70 °C por 24 h, antes de serem liofilizadas (LIOTOP, L108). As frações peptídicas liofilizadas foram então reconstituídas em água destilada em concentrações apropriadas para avaliação de atividade antioxidante e hipocolesterolêmica. Os rendimentos foram calculados de acordo com a Eq. (9):

$$\text{Rendimento}(\%) = \frac{m_{\text{ultrafiltrado}}}{m_{\text{hidrolisado respectivo}}} * 100 \quad (9)$$

4.5.8 Avaliação da bioatividade dos hidrolisados e frações peptídicas

As bioatividades foram analisadas nos hidrolisados (atividade antioxidante e antibacteriana) e nas frações peptídicas (atividade antioxidante e hipocolesterolêmica).

4.5.8.1. Atividade antioxidante *in vitro*

A atividade antioxidante foi avaliada nos hidrolisados e nas frações peptídicas. Foram avaliados três diferentes métodos com modificações: capacidade de sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH) (CHENG; MOORE; YU, 2006), capacidade de sequestro do radical 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS⁺) (RE et al., 1999) e capacidade de redução do ferro (FRAP) de acordo com Pulido, Bravo e Saura-Calixto (2000).

Os resultados que apresentaram maiores atividades foram selecionados para avaliar os seus efeitos na oxidação lipídica em carne moída (O'KEEFE; WANG, 2006) e verificar o poder antioxidante dos hidrolisados/frações peptídicas em células de *Saccharomyces cerevisiae* submetidas a estresse oxidativo induzido pelo peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (BARONI et al., 2012).

i. Capacidade de sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picrilidrazil

Uma mistura reacional foi utilizada, contendo 400 µL de cada concentração de hidrolisado/fração peptídica (0,5; 1; 2 e 3 mg mL⁻¹) e 400 µL de solução preparada de DPPH 0,2 mM. A absorção da mistura (a 515 nm) foi medida após 45 min de reação, tempo definido após testes preliminares (Apêndice 6), em espectrofotômetro (Biospectro SP22, Brasil). A concentração de hidrolisado/fração peptídica (mg hidrolisado/fração peptídica g⁻¹ DPPH) que causou 50% (EC₅₀) de redução do radical DPPH foi calculada a partir de uma curva padrão de DPPH (10 – 60 µM) (Apêndice 7). Para calcular o EC₅₀, substituiu-se a absorbância equivalente a 50% da concentração de DPPH e encontrou-se o valor correspondente ao hidrolisado/fração peptídica necessário para reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH (EC₅₀) a partir de um gráfico de regressão não-linear das absorbâncias obtidas versus concentração da amostra (RUFINO et al., 2007).

ii. Capacidade de sequestro do radical 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)

O radical ABTS⁺ foi formado pela reação de 5 mL da solução de ABTS 7 mM com 88 µL da solução de persulfato de potássio 140 mM, incubados à temperatura de 25 °C e na ausência de luz, durante 16 h. Uma vez formado, o radical foi diluído com etanol P.A. até a obtenção do valor de absorbância de 0,700 ± 0,030 a 734 nm em espectrofotômetro (Biospectro

SP22, Brasil). Foi utilizado como padrão, o Trolox, um antioxidante sintético análogo à vitamina E, nas concentrações de 20 a 80 μM (Apêndice 8). Sendo assim, plotou-se as concentrações de Trolox (μM) versus as respectivas absorbâncias e calculou-se a equação da reta.

A partir de diferentes concentrações de hidrolisados/frações peptídicas (0,5; 1; 2 e 3 mg mL^{-1}), em ambiente escuro, transferiu-se um alíquota de 600 μL de cada concentração para tubos de ensaio com 200 μL do radical ABTS^+ . A leitura foi feita após 6 min de reação a 734 nm, e o etanol foi utilizado como branco. A partir das absorbâncias obtidas das diferentes concentrações, plotou-se a absorbância versus a concentração (mg mL^{-1}). Em seguida, determinou-se a equação da reta. O cálculo foi feito substituindo na equação da reta a absorbância equivalente a 1000 μM do padrão Trolox. O valor obtido corresponde a μM Trolox g^{-1} hidrolisado/fração peptídica.

iii. Capacidade de redução do ferro

Para a determinação da capacidade de redução do ferro (FRAP) no escuro, 90 μL de cada concentração de hidrolisado/fração peptídica (0,5; 1; 2 e 3 mg mL^{-1}) foi misturada com 270 μL de água e 2,7 mL do reagente FRAP (25 mL de tampão de acetato 0,3 M, pH 3,6; 2,5 mL de tripiridiltiazina (TPTZ) 10 mM em HCl 40 mM e 2,5 mL de cloreto férrico 20 mM). A mistura foi incubada à 37 °C por 30 min. A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 595 nm (Biospectro SP22, Brasil). Sulfato ferroso foi utilizado como padrão nas concentrações de 200 a 2000 μM (Apêndice 9). Sendo assim, plotou-se as concentrações de sulfato ferroso (μM) no eixo x e as respectivas absorbâncias no eixo y e calculou-se a equação da reta.

A partir das absorbâncias obtidas das diferentes concentrações, plotou-se a absorbância no eixo y e a concentração (mg mL^{-1}) no eixo x. Em seguida, determinou-se a equação da reta. O cálculo foi feito substituindo na equação da reta a absorbância equivalente a 1000 μM de sulfato ferroso. Os resultados foram expressos como μmol sulfato ferroso g^{-1} hidrolisado/fração peptídica.

4.5.8.2. Determinação do efeito das frações peptídicas selecionadas na oxidação lipídica da carne

As frações de hidrolisado com maior capacidade de redução do Ferro (FRAP) e atividade de captura do radical livre DPPH foram selecionadas e avaliadas seus efeitos sobre a

oxidação lipídica em carne moída (O'KEEFE; WANG, 2006). As frações selecionadas para o teste foram: CPC1-F F2, CPC1-A F2, CPC1-S F2, CPC2-S F2, CPC2-F F2, CF-S F3, CF-A F3 e PRF-A F3. As amostras de carne moída foram obtidas no mercado local.

A amostra de carne moída foi embalada e armazenada em -20 °C até análise posterior. Para cada amostra, uma porção de carne bovina (250 g) foi homogeneizada com auxílio de um bastão de vidro com as frações peptídicas em duas quantidades diferentes (62,5 e 125 mg) e colocados em tubos de 50 mL, pesados e centrifugados para remover o ar. Um controle foi utilizado (carne moída sem a presença das frações peptídicas). As misturas de carne bovina foram cozidas até a temperatura interna de 71 °C em um banho de água quente para promover a oxidação lipídica. A temperatura interna foi monitorada por um termopar de tamanho agulha inserido no centro dos tubos durante o cozimento. Depois de esfriar, as amostras de carne foram colocadas em bandejas, imediatamente cobertas com filme PVC e armazenadas a 4 °C para evitar a potencial contaminação microbiana.

A extensão da oxidação lipídica em cada amostra de carne foi determinada pelo ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) nos dias 0, 2, 4 e 6 pós-cozimento. A unidade final do valor TBARS foi calculada com a curva padrão (Apêndice 10) e expressa como mg de equivalentes de malonaldeído (MDA) por kg de amostra (mg equivalente de MDA kg⁻¹ carne).

4.5.8.3. Atividade antioxidante *in vivo*

As frações de hidrolisado com maior capacidade de redução do Ferro (FRAP) e atividade de captura do radical livre DPPH foram selecionadas e avaliadas seus efeitos em células de *Saccharomyces cerevisiae* submetidas ao estresse oxidativo induzido pelo peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (BARONI et al., 2012). Testamos o estresse oxidativo gerado pelo peróxido de hidrogênio, o que provoca danos celulares pela produção de radicais hidroxílicos através da reação Heber-Weiss/Fenton. As frações selecionadas para o teste foram as mesmas para a determinação do efeito na oxidação lipídica da carne: CPC1-F F2, CPC1-A F2, CPC1-S F2, CPC2-S F2, CPC2-F F2, CF-S F3, CF-A F3 e PRF-A F3.

Este ensaio foi realizado utilizando células de *S. cerevisiae* BY4741 (Invitrogen™, código 95400.BY4741). As células foram cultivadas em caldo líquido YPD, usando um agitador orbital a 28 °C e 160 rpm (a proporção de frasco:meio de 5:1). Células de levedura na fase exponencial (Abs₆₀₀: 0,5-0,7) foram transferidas para meio fresco (Abs₆₀₀: 0,2). O controle para as células de levedura (C), para cada fração peptídica (C CPC1-F F2, C PRF-A F3, C

CPC2-S F2, C CF-S F3, C CPC1-S F2, C CPC2-F F2, C CF-A F3 e C CPC1-A F2) a uma concentração final de $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ e o controle das células de levedura contendo H_2O_2 ($0,75 \text{ mmol L}^{-1}$) [H_2O_2] foram realizados. Para o teste, as células de levedura contendo peróxido e fração peptídica (CPC1-F F2 + H_2O_2 , PRF-A F3 + H_2O_2 , CPC2-S F2 + H_2O_2 , CF-S F3 + H_2O_2 , CPC1-S F2 + H_2O_2 , CPC2-F F2 + H_2O_2 , CF-A F3 + H_2O_2 e CPC1-A F2 + H_2O_2) foram utilizadas. Após a transferência, as células de levedura (controle), as células de levedura com fração peptídica (controle das frações peptídicas), as células de levedura com H_2O_2 e as células de levedura com fração peptídica e H_2O_2 foram incubadas por 1 h a 28°C e 160 rpm. A dose ideal para as frações peptídicas ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$) foi determinada a partir de testes preliminares (Apêndice 11), expondo células em diferentes concentrações de frações peptídicas (0,1; 0,5; 1 e 2 mg mL^{-1}). A concentração escolhida foi aquela menor que promoveu o crescimento celular em comparação com leveduras expostas a H_2O_2 ($0,75 \text{ mmol L}^{-1}$) sem adição de frações peptídicas.

A viabilidade celular foi analisada pelo plaqueamento das amostras em meio sólido YPD (Yeast extract – Peptone – Dextrose), 28°C por 48 h. A sobrevivência de cem por cento foi considerada o número de colônias observadas na placa do controle (células de levedura). Determinou-se a diluição adequada (10^{-3}). A atividade das frações peptídicas foi expressa como a porcentagem de sobrevivência de *S. cerevisiae* em relação ao controle.

4.5.8.4. Atividade antibacteriana

A avaliação do efeito antibacteriana dos hidrolisados proteicos foi realizada por meio de três metodologias fenotípicas: disco difusão, concentração mínima inibitória e concentração mínima bactericida. Foram testados os efeitos antibacterianos dos hidrolisados sobre as cepas padrão das bactérias *Escherichia coli* O157:H7 (ATCC 43895) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 10832).

i. Reativação dos micro-organismos

As bactérias utilizadas no experimento foram mantidas sob refrigeração em ágar inclinado BHA (*Brain Heart Infusion Agar*). Para realizar a reativação, uma alçada dessas bactérias foi transferida para caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) e incubadas em estufa durante 24 h a 37°C . Após, uma alçada desse crescimento foi estriada em placas de Petri com meio BHA, e incubadas por 24 h a 37°C , para o isolamento das colônias.

Do crescimento bacteriano nas placas de Petri, foi extraída uma alçada e ressuspendida em solução salina (NaCl 0,85%), a qual foi padronizada na concentração 1 na escala de McFarland (3×10^8 UFC mL⁻¹).

ii. Disco difusão

A análise de disco difusão foi realizada de acordo com protocolo proposto pelo Manual *Clinical and Laboratory Standards Institute* – CLSI (CLSI, 2015a).

A solução salina contendo o inóculo (3×10^8 UFC mL⁻¹) foi semeada com auxílio de um *swab* estéril na superfície de placas com ágar BHA. Em seguida, foram adicionados discos de papel filtro esterilizados com diâmetro de 6 mm. Após, 20 µL de hidrolisado (10 mg mL⁻¹) foram impregnados sobre os discos de papel e as placas incubadas por 24 h a 37 °C. Logo após este período foi efetuada a medição dos halos de inibição. A atividade antibacteriana foi avaliada considerando os seguintes parâmetros: nenhuma atividade foi considerada (-), uma zona de inibição (diâmetro) < 10,0 mm foi considerado inativo (+), diâmetro entre 10,0 e 13,0 mm foram considerados parcialmente ativos (++) e diâmetro > 14,0 mm foram considerados ativos (+++) (VALGAS et al., 2007).

iii. Concentração mínima inibitória

A concentração mínima inibitória (CMI) foi realizada de acordo com protocolo proposto pelo Manual *Clinical and Laboratory Standards Institute* – CLSI (CLSI, 2015b) com modificações.

Para isto foram utilizadas placas de microtitulação de 96 poços estéril. Cada poço continha 100 µL de caldo BHI, 100 µL de inóculo (80 µL de caldo BHI e 20 µL de água salina com crescimento bacteriano [3×10^8 UFC mL⁻¹]) e 100 µL de hidrolisado em concentrações de 10; 5; 1; 0,1 e 0,01 mg mL⁻¹. A inibição do crescimento bacteriano foi monitorada por medida da absorbância a 620 nm em um leitor de microplacas (EE, Polaris, Celer, Brasil) imediatamente após o preparo das placas e após 24 h de incubação a 37 °C. Os valores de absorbância dos poços em concentrações correspondentes foram comparados com o controle negativo (poços contendo caldo BHI) e controle positivo (poços contendo o inóculo). A CMI foi considerada como a concentração em que houve redução de 50% do crescimento bacteriano no meio de cultura.

iv. Concentração mínima bactericida

Após a realização da CMI, foram retirados 15 µL dos poços de todas as amostras, estriados em placas de Petri com ágar BHA e incubados por 24 h a 37 °C. Foi considerada a concentração mínima bactericida (CMB), os valores das placas em que não houve crescimento bacteriano (CLSI, 2015b).

4.5.8.5. Atividade hipocolesterolêmica *in vitro*

Para a avaliação da atividade hipocolesterolêmica *in vitro* foi realizada o ensaio de inibição da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (HMG-CoA redutase) utilizando o kit da Sigma-Aldrich CS1090 (SIGMA, 2007) nas frações peptídicas menores que 3 kDa. O ensaio baseia-se na leitura espectrofotométrica do decréscimo da absorbância a 340 nm, representando a oxidação da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH) pela subunidade catalítica de HMG-CoA redutase, na presença do substrato HMG-CoA, como apresentado abaixo:



A pravastatina (250 nM) foi utilizada como controle positivo, uma vez que inibe a ação catalítica da HMG-CoA redutase. Aliquotas contendo 4 µL de NADPH (concentração final de 400 µM) e 12 µL de substrato HMG-CoA (concentração final de 0,3 mg mL⁻¹) foram pipetadas em placas de 96 poços em tampão (pH 7,4). As análises foram iniciadas (tempo 0), após a adição de 2 µL da HMG-CoA redutase (0,50 - 0,70 mg mL⁻¹ de proteína) em um volume final de 0,2 mL por poço. A mistura foi incubada a 37 °C na ausência de inibidores (controle), na presença da alíquota de 1 µL de pravastatina e em várias concentrações de proteína de cada fração peptídica (1, 2 e 3 mg mL⁻¹), separadamente e em triplicata. As quantidades de NADPH consumidas foram monitorados a cada 2 min durante 20 min em leitor de placas SpectraMax M5 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA). Os resultados foram calculados como µmol de NADPH oxidado min⁻¹ (U) por mg de amostra, segundo Eq. (10). Uma Unidade converte 1 µmol de NADPH a NADP⁺ por min à 37 °C.

$$\frac{\text{Unidades}}{\text{mg amostra}} = \frac{\frac{\Delta\text{Abs amostra}}{\text{min}} - \frac{\Delta\text{Abs branco}}{\text{min}}}{12,44 * V * 0,6 * 0,55} * 0,2 \quad (10)$$

Onde: 12,44 = representa o 2 NADPH consumido na reação; 0,2 = volume total da reação em mL; V = volume de enzima utilizado (0,006 mL); 0,6 = concentração de enzima em mg_{proteína} mL⁻¹; 0,55 = caminho de luz em cm.

Levando em consideração a reação na ausência de inibidores (Unidades mg⁻¹_{atividade}), os resultados foram expressos como % de inibição da atividade da enzima na presença das frações peptídicas (Unidades mg⁻¹_{amostra}) como mostra a Eq. (11).

$$\text{Capacidade de inibição (\%)} = \frac{\left(\frac{\text{Unidades}}{\text{mg P}_{\text{atividade}}} - \frac{\text{Unidades}}{\text{mg P}_{\text{amostra}}} \right)}{\frac{\text{Unidades}}{\text{mg P}_{\text{atividade}}}} * 100 \quad (11)$$

4.5.9 Análise estatística

Todos os ensaios foram realizados em triplicata, exceto análises de infravermelho, eletroforese, características térmicas, menor capacidade de gelificação e microscopia eletrônica de varredura, e os resultados foram avaliados estatisticamente mediante a Análise de Variância (ANOVA) e as médias comparadas entre si através do teste de Tukey (p < 0,05) utilizando o programa Statistica 5.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. INFLUÊNCIA DO PROCESSO DE ISOLAMENTO DAS PROTEÍNAS DE CHIA NAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

A Tabela 2 apresenta as propriedades físico-químicas do subproduto (CF), da fração rica em proteína (PRF) e dos concentrados proteicos (CPC1 e CPC2) de chia. Estes resultados estão em contraste com os de Segura-Campos et al. (2013) para a fração PRF, que reportou valores maiores de cinzas (8,8%) e fibras (11,5%), e valores menores para lipídios (0,5%) e proteínas (44,6%) aos obtidos neste estudo (Tabela 2). Detectamos diferenças significativas entre as amostras ($p < 0,05$). O teor de proteínas foi concentrando dependendo do método utilizado para a extração das proteínas: $CPC2 > CPC1 > PRF > CF$. Assim, os concentrados CPC1 e CPC2 são bons materiais para o processo de hidrólise pelo alto conteúdo de proteínas. O teor de lipídios da fração PRF foi maior ($p < 0,05$) e o teor de lipídios dos concentrados CPC1 e CPC2 foi menor ($p < 0,05$) do que para o subproduto CF. O conteúdo lipídico do subproduto CF pode ser considerado como um interferente para obtenção dos concentrados proteicos, principalmente causado pela adição de hidróxido de sódio durante o processo de extração, que pode produzir reações de saponificação (ALLINGER, 1976).

Verificamos que o método químico utilizado na obtenção dos concentrados CPC1 e CPC2 foi mais eficiente para a extração de proteínas do que o método de fracionamento em seco utilizado na obtenção da fração PRF, devido ao menor teor de lipídios e maior teor de proteína. Além disso, o rendimento do fracionamento em seco ($14,1 \pm 2,3\%$ m/m) foi menor do que o obtido por qualquer dos processos químicos (CPC1, $17,1 \pm 0,7\%$ [m/m] e CPC2, $19,2 \pm 1,4\%$ [m/m]). No entanto, a principal vantagem do método de fracionamento em seco é a simplicidade do processo, juntamente com o decréscimo ou ausência de água ou outros solventes, com a consequente vantagem de não gerar efluentes e resíduos (VÁZQUEZ-OVANDO et al., 2010). Dependendo do processo utilizado, foi possível obter produtos com altos níveis de proteína, que podem ser utilizados como matéria-prima para a produção de hidrolisados proteicos. Percebe-se que, o método de peneiramento aumentou em 26,5% o teor de proteína e o método químico para o concentrado 1 (CPC1), aumentou em 48,5% e para o concentrado 2 (CPC2), aumentou em 50,7% o teor de proteína em comparação ao subproduto da produção de óleo de chia (CF).

Tabela 2 - Propriedades físico-químicas do subproduto, farinha de chia (CF), da fração rica em proteína (PRF) e dos concentrados proteicos (CPC1 e CPC2)

	CF	PRF	CPC1	CPC2
Composição proximal (g 100 g⁻¹)				
Umidade	7,5 ± 0,09 ^a	7,9 ± 0,16 ^a	4,3 ± 0,27 ^b	7,9 ± 0,30 ^a
Cinzas ¹	6,7 ± 0,05 ^b	7,6 ± 0,02 ^a	1,2 ± 0,19 ^c	0,9 ± 0,01 ^d
Lípidios ¹	11,8 ± 0,47 ^b	16,6 ± 0,79 ^a	4,0 ± 0,35 ^c	4,2 ± 0,01 ^c
Proteínas ¹	36,5 ± 0,54 ^d	49,7 ± 0,56 ^c	70,9 ± 0,93 ^b	74,1 ± 0,81 ^a
Fibras ¹	21,4 ± 0,24 ^a	5,0 ± 0,26 ^b	0,2 ± 0,08 ^c	0,1 ± 0,05 ^c
Outros carboidratos ¹	23,6	21,1	23,7	20,7
Fração proteica (% do total)				
Albuminas	22,8 ± 0,08 ^a	10,5 ± 0,26 ^b	5,6 ± 0,14 ^c	3,1 ± 0,05 ^d
Globulinas	22,4 ± 1,45 ^a	16,1 ± 0,48 ^b	6,3 ± 0,05 ^c	6,7 ± 0,07 ^c
Glutelinas	48,9 ± 0,65 ^c	68,3 ± 2,39 ^b	81,5 ± 1,22 ^a	84,5 ± 4,62 ^a
Prolaminas	5,8 ± 0,06 ^b	5,1 ± 0,20 ^c	6,6 ± 0,23 ^a	5,7 ± 0,08 ^b
Cor				
L*	49,1 ± 1,15 ^c	59,8 ± 0,84 ^b	63,1 ± 1,04 ^a	57,9 ± 0,09 ^b
a*	4,1 ± 0,08 ^a	3,0 ± 0,04 ^c	4,2 ± 0,13 ^a	3,3 ± 0,08 ^b
b*	15,2 ± 0,14 ^c	16,4 ± 0,15 ^b	23,5 ± 0,11 ^a	23,2 ± 0,20 ^a
Índice de brancura (IB)	3,7 ± 1,16 ^b	10,6 ± 1,16 ^a	-7,37 ± 1,25 ^c	-11,6 ± 0,67 ^d

¹base seca. Todos os resultados são expressos como média ± desvio padrão em triplicatas. Desvio padrão seguido de diferentes letras minúsculas na mesma linha apresentam diferença significativa (p < 0,05).

As glutelinas representaram a maior fração de proteínas de chia neste estudo (Tabela 2). Em outros estudos, as globulinas (SANDOVAL-OLIVEROS; PAREDES-LÓPEZ, 2013; VÁZQUEZ-OVANDO et al., 2010) e as prolaminas (OLIVOS-LUGO; VALDIVIA-LOPEZ; TECANTE, 2010) representaram a maior fração de proteínas de chia. Para Sandoval-Oliveros e Paredes-López (2013), a fração de glutelina mostrou quatro bandas com tamanhos moleculares em torno de 20-30 kDa com certa semelhança com as globulinas. Isso é consistente com a classificação de Fukushima (1991) que incluiu essas duas frações em uma única, com base em critérios de homologia estrutural primária. Na análise eletroforética (Figura 17) observamos bandas com alta intensidade em 20-30 kDa. As glutelinas são tipicamente encontradas em sementes de vegetais, como cereais, incluindo trigo (GRAVELAND; BONGERS; BOSVELD, 1979) e arroz (ZHAO et al., 2012a). No arroz, as principais proteínas

de armazenamento são as glutelinas (65-85%) enquanto que as prolaminas são a menor fração (HUEBNER et al., 1990). Os métodos químicos recuperaram principalmente glutelinas, associadas ao uso de hidróxido de sódio e ácido clorídrico no processo. Entretanto, com a utilização de processos de extração das proteínas houve mudanças na distribuição (%) dessas proteínas nas diferentes amostras, as albuminas e globulinas diminuíram, as glutelinas aumentaram e as prolaminas se mantiveram com valores próximos. O menor valor obtido para as albuminas foi para o concentrado CPC2, que pode estar relacionado à menor solubilidade proteica obtida nesta fração proteica (Figura 20A).

A Figura 15 apresenta as fotografias das amostras de chia utilizadas neste estudo. O índice de brancura (IB) representa a cor de um objeto entre branco e amarelo. Neste estudo, encontramos que a fração PRF e o subproduto CF tendem a ser mais claros, enquanto que os concentrados CPC1 e CPC2 tendem a ser amarelos. Os valores do parâmetro de coordenadas de cromaticidade (b^*) (Tabela 2) confirmam que estes concentrados tendem a ser amarelos. As cores das proteínas isoladas de vegetais geralmente estão associados a um produto de reações de proteína-polifenol, que pode produzir polímeros altamente coloridos (MARCONE; KAKUDA, 1999). Assim, a diferença de cor entre os concentrados (CPC1; CPC2), o subproduto CF e a fração PRF foi provavelmente porque na extração de concentrados alguns compostos fenólicos, bem como seus produtos de oxidação presentes, podem ter co-precipitado com as proteínas.

Figura 15 - Fotografias do subproduto (CF), fração rica em proteína (PRF), concentrado proteico 1 (CPC1) e concentrado proteico 2 (CPC2) utilizados neste estudo



A composição de aminoácidos do subproduto CF, da fração PRF e dos concentrados CPC1 e CPC2 é apresentada na Tabela 3.

Tabela 3 - Composição de aminoácidos do subproduto, farinha de chia (CF), fração rica em proteína (PRF), concentrado proteico 1 (CPC1) e concentrado proteico 2 (CPC2)

Aminoácidos	mg aminoácido g ⁻¹ proteína			
	CF	PRF	CPC1	CPC2
Ácido aspártico	97,73 ± 0,76 ^a	106,14 ± 11,58 ^a	88,23 ± 6,01 ^a	94,51 ± 3,35 ^a
Ácido glutâmico	167,73 ± 0,36 ^a	168,65 ± 7,11 ^a	183,53 ± 3,86 ^a	182,99 ± 1,02 ^a
Serina	52,65 ± 1,04 ^a	51,30 ± 1,23 ^a	53,77 ± 0,24 ^a	54,12 ± 0,01 ^a
*Glicina	41,44 ± 0,07 ^{a,b}	40,91 ± 0,76 ^b	42,50 ± 0,81 ^{a,b}	43,43 ± 0,14 ^a
Histidina	33,29 ± 0,64 ^a	33,14 ± 0,07 ^a	30,70 ± 4,09 ^a	32,03 ± 0,64 ^a
*Arginina	109,76 ± 0,26 ^b	106,33 ± 0,62 ^c	112,92 ± 0,23 ^a	109,51 ± 0,85 ^b
*Treonina	36,67 ± 0,30 ^{a,b}	37,87 ± 0,45 ^a	35,55 ± 0,61 ^b	36,26 ± 0,76 ^{a,b}
Alanina	48,52 ± 1,30 ^a	47,92 ± 0,37 ^a	45,71 ± 0,19 ^a	41,04 ± 9,44 ^a
Prolina	52,55 ± 0,71 ^a	48,43 ± 4,22 ^a	48,61 ± 2,03 ^a	49,07 ± 1,36 ^a
*Tirosina	42,94 ± 0,30 ^a	40,28 ± 1,09 ^b	39,90 ± 0,41 ^b	36,98 ± 0,27 ^c
Valina	46,06 ± 0,32 ^a	48,27 ± 1,71 ^a	45,22 ± 0,03 ^a	43,75 ± 2,28 ^a
*Metionina	32,57 ± 0,11 ^b	29,76 ± 0,54 ^c	34,07 ± 0,76 ^{a,b}	35,85 ± 0,08 ^a
*Cisteína	3,94 ± 0,46 ^{b,c}	3,30 ± 0,10 ^c	7,76 ± 1,23 ^{a,b}	10,53 ± 1,37 ^a
Isoleucina	36,25 ± 0,25 ^a	38,93 ± 2,00 ^a	33,68 ± 0,20 ^a	33,44 ± 1,99 ^a
Leucina	75,77 ± 1,17 ^a	76,37 ± 3,19 ^a	73,55 ± 1,27 ^a	72,02 ± 0,37 ^a
Fenilalanina	70,63 ± 0,30 ^a	71,97 ± 5,53 ^a	63,97 ± 2,10 ^a	64,68 ± 0,54 ^a
Lisina	51,46 ± 4,06 ^a	50,41 ± 2,04 ^a	60,27 ± 1,25 ^a	59,74 ± 4,75 ^a
Triptofano	ND	ND	ND	ND
AA essenciais	382,70	386,72	377,01	377,77
Total de AA	999,96	999,98	999,94	999,95

*apresentaram diferença significativa. Todos os resultados são expressos como média ± desvio padrão em triplicata. Desvio padrão seguido de diferentes letras minúsculas na mesma linha apresentam diferença significativa (p < 0,05). ND: não determinado. AA: aminoácidos. AA essenciais: valina, leucina, isoleucina, lisina, treonina, metionina, histidina, fenilalanina e triptofano.

Entre as amostras, detectamos diferenças significativas (p < 0,05) para a glicina, a arginina, a treonina, a tirosina, a metionina e a cisteína. Estes dados sugerem que a escolha do método de isolamento da proteína afeta a composição dos aminoácidos. Havia uma alta concentração de ácido glutâmico, arginina, ácido aspártico, leucina e fenilalanina em todas as

amostras avaliadas. Olivos-Lugo, Valdivia-Lopez e Tecante (2010) relataram resultados semelhantes para farinha desengordurada e proteína isolada de chia com altas concentrações de arginina, ácido glutâmico, ácido aspártico e leucina. A presença de níveis elevados de ácido glutâmico é de interesse na indústria de alimentos, devido ao seu potencial para estimular os sistemas nervoso e imunológico em humanos (PAREDES-LOPEZ, 1991).

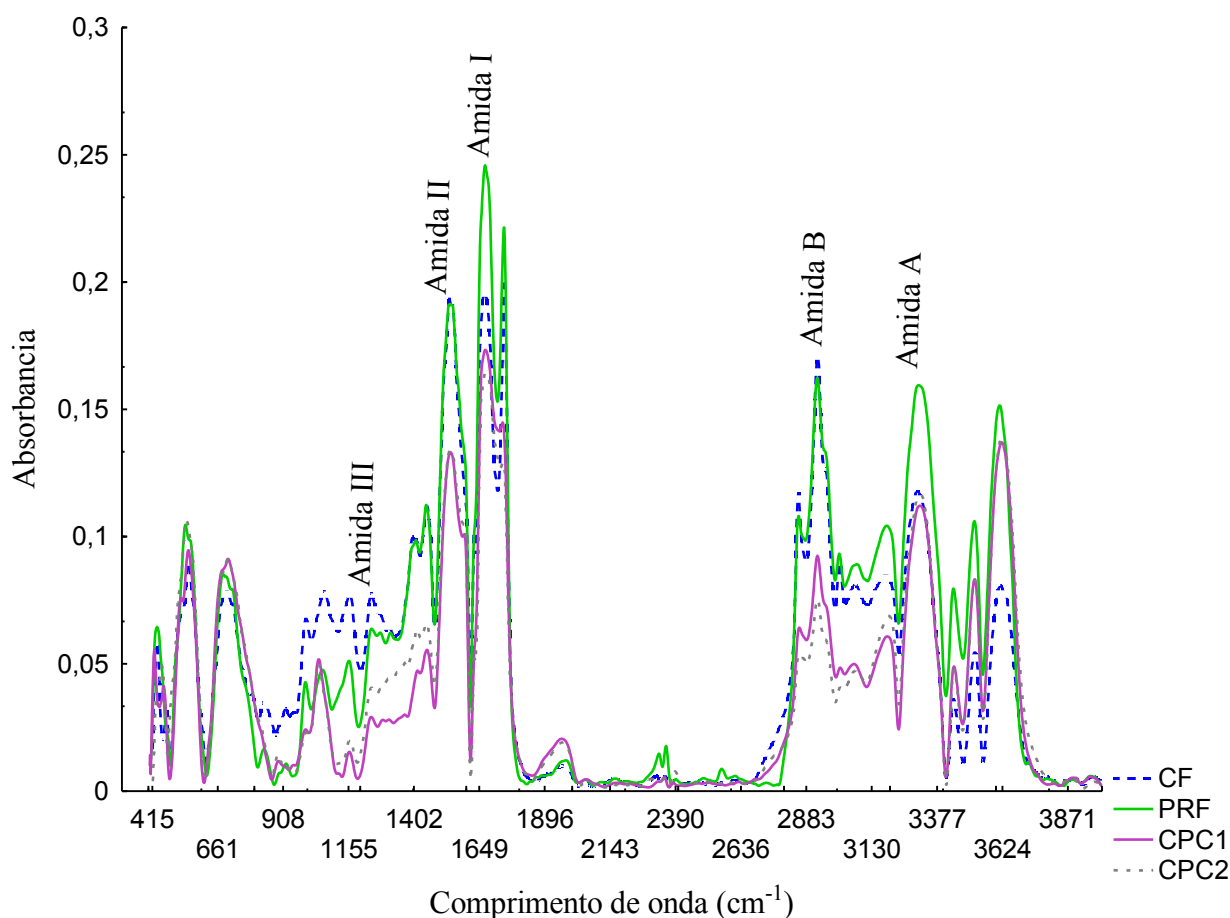
O concentrado CPC2 apresentou uma alta concentração de metionina e cisteína. O conteúdo alto de cisteína resulta em uma alta densidade de pontes dissulfeto, ocasionada pela exposição de aminoácidos hidrofóbicos que ocorre durante a desnaturação proteica, formando um agregado maior e tornando-se menos solúvel. Por causa disto, o concentrado CPC2 não é hidrofílico, resultando com baixa solubilidade de proteína (Figura 20A). Do conteúdo total de aminoácidos também foram observadas diferenças por Stone et al. (2015) na análise dos métodos de extração para isolados proteicos de ervilha de várias cultivares. Sandoval-Oliveros e Paredes-López (2013) analisaram a composição de aminoácidos da farinha de chia desengordurada sendo considerada como uma boa fonte de aminoácidos sulfurados, ácido aspártico e glutâmico. Vázquez-Ovando et al. (2010) encontraram que a concentração de alguns aminoácidos como a tirosina, a histidina, a arginina e a prolina, aumentou na fração rica em proteína de chia, utilizando um processamento a seco (peneiramento), em relação a farinha desengordurada. Neste estudo a arginina, a tirosina e a metionina foram menores na fração PRF comparado ao subproduto CF. É provável que os lipídios ainda presentes no subproduto CF influenciaram este resultado, diminuindo a extração das proteínas.

Os aminoácidos essenciais das proteínas de sementes representam 35-45% dos aminoácidos totais. Aqui, encontramos valores de aminoácidos essenciais de 38,3; 38,7; 37,7 e 37,8% para CF, PRF, CPC1 e CPC2 respectivamente, que são semelhantes aos achados de Olivos-Lugo, Valdivia-Lopez e Tecante (2010) (41,8 e 42,8% para proteínas de farinha de chia desengordurada e isolado proteico, respectivamente). No concentrado CPC2 foi encontrado maior quantidade de metionina (aminoácido hidrofóbico) seguido pelo concentrado CPC1, subproduto CF e fração PRF, que se correlaciona com nossos dados de solubilidade da proteína. A qualidade proteica da chia é uma contribuição nutracêutica importante para os alimentos. Os peptídeos presentes em hidrolisados proteicos têm diferentes atividades biológicas que dependem da sua composição e sequência de aminoácidos (SAADI et al., 2015). Isso sugere que os peptídeos obtidos das diferentes frações/amostras de proteínas de chia provavelmente terão diferentes bioatividades.

5.2. INFLUÊNCIA DO PROCESSO DE ISOLAMENTO DAS PROTEÍNAS NA ESTRUTURA PROTEICA

A espectroscopia no infravermelho é capaz de fornecer informações sobre os grupos funcionais. A Figura 16 apresenta o espectro FTIR das amostras de chia. As bandas Amida I e II são as mais relevantes, sendo a banda de amida I (1600 a 1700 cm^{-1}) a mais informativa sobre a estrutura secundária das proteínas. Essas bandas são principalmente devido à sensibilidade das ligações peptídicas C=O às várias conformações das estruturas secundárias proteicas (FORATO; BERNARDES FILHO; COLNAGO, 1998). Os principais locais de pico espectral e suas atribuições de proteínas de chia são fornecidas no Apêndice 12.

Figura 16 - Espectro FTIR de CF (farinha de chia parcialmente desengordurada- subproduto), PRF (fração rica em proteína), CPC1 (concentrado proteico 1) e CPC2 (concentrado proteico 2)

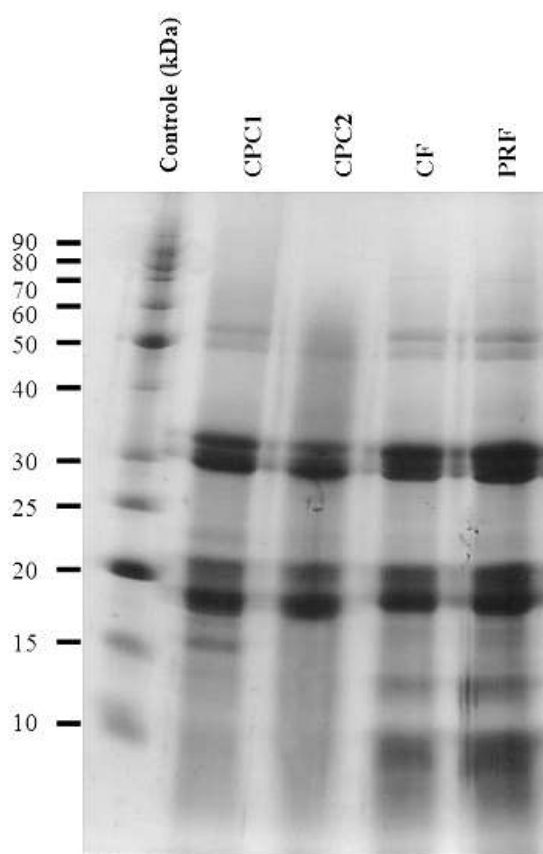


A principal diferença observada neste espectro está relacionada aos picos de Amida I e II: a fração PRF apresenta a banda mais alta, seguida do subproduto CF e concentrados CPC1 e CPC2. Esta mudança indica que o processo químico enfraquece as ligações de hidrogênio da

estrutura β -sheets e que isso ocorre por causa do desdobramento da proteína (TANG; MA, 2009). O intervalo padrão de absorção da Amida II está entre 1550 e 1600 cm^{-1} e está associado à ligação N-H juntamente com as vibrações de estiramento C-N. Os picos de Amida II das proteínas extraídas foram observados entre 1549 e 1551 cm^{-1} . As ligações de Amida III foram observadas entre 1231 e 1234 cm^{-1} . Além disso, a exposição prolongada das proteínas a baixas temperaturas durante o processo de liofilização poderia ter produzido um aumento da desordem das estruturas. Dos aminoácidos alifáticos, apenas os picos de prolina estão dentro da faixa de 1400-1456 cm^{-1} . Os picos de prolina com considerável intensidade infravermelha parecem ser aqueles em 1448-1452 cm^{-1} (Figura 16). Os picos de triptofano com considerável intensidade infravermelha parecem ser aqueles em 1334 e 1455 cm^{-1} (FABIAN et al., 1994). Detectamos picos de triptofano no intervalo 1398-1415 cm^{-1} (Figura 16). Assim, devido as diferenças relatadas foi constatado que o método de isolamento afeta a estrutura secundária de proteínas.

A Figura 17 apresenta o perfil eletroforético das amostras de chia estudadas. Como já relatado, as principais subunidades do perfil proteico apareceram entre 20-30 kDa, fração das glutelinas.

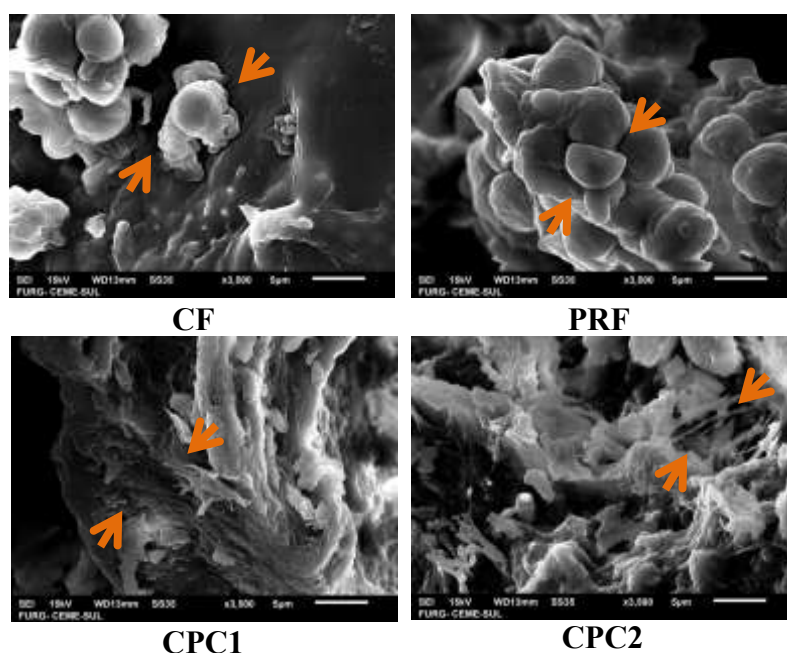
Figura 17 - Perfil eletroforético do subproduto farinha (CF), da fração rica em proteína (PRF), do concentrado proteico (CPC1) e do concentrado proteico 2 (CPC2) de chia



No entanto, não foram observadas bandas de alta e baixa intensidade no concentrado CPC2 comparado ao concentrado CPC1 que apresentou três bandas (51-55 kDa e 15 kDa). O subproduto CF e a fração PRF apresentaram três bandas entre 12 e 14 kDa. No processo para obter os concentrados proteicos de chia CPC1 e CPC2 houve perda de proteínas de baixa massa molecular, provavelmente devido as condições aplicadas no método químico de isolamento das proteínas. O perfil eletroforético das frações proteicas de chia foram estudadas por Orona-Tamayo et al. (2015). As albuminas apresentaram bandas de baixa intensidade com MM de ≈ 10 a 250 kDa com cinco bandas de intensidade que variaram em torno de 15, 20, 28, 35 e 80 kDa. As globulinas exibiram oito bandas de intensidade de 10, 15, 18, 25, 30, 33, 50 e 60 kDa. As prolaminas exibiram três bandas que variaram em torno de 16, 17 e 19 kDa e outras bandas menos intensas de 30-40 kDa. As glutelinas apresentaram quatro bandas principais de 20, 25, 30 e 33 kDa e outras bandas menos intensas entre 10, 14, 54 e 60 kDa.

A Figura 18 apresenta as micrografias em um microscópio eletrônico de varredura (MEV) das amostras de chia. As morfologias de superfície dos concentrados CPC1 e CPC2 são diferentes do que a do subproduto CF: os concentrados apresentam estruturas rugosas e fibrosas, enquanto o subproduto apresenta estrutura globular e regular. A morfologia superficial da fração PRF foi semelhante ao do subproduto CF. Estes achados sugerem que as condições dos métodos de extração química alteram a morfologia superficial das proteínas de chia.

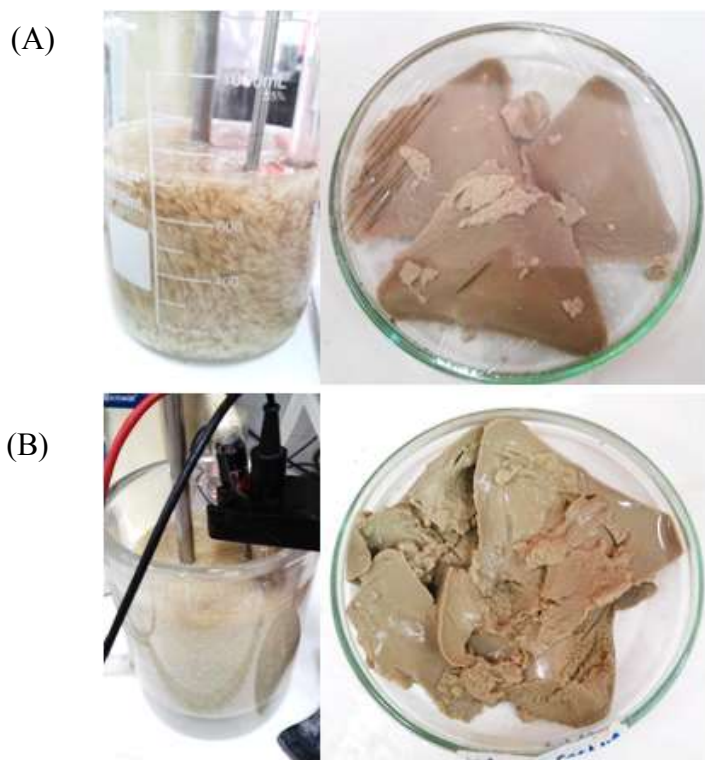
Figura 18 - Micrografias utilizando um microscópio eletrônico de varredura do subproduto CF (farinha de chia), fração PRF (fração rica em proteína), concentrado CPC1 (concentrado proteico de chia 1) e concentrado CPC2 (concentrado proteico de chia 2)



Símbolos de seta: diferenças encontradas na estrutura das proteínas obtidas.

Enquanto o subproduto CF e a fração PRF não receberam nenhum processamento químico, o precipitado dos concentrados proteicos CPC1 e CPC2 formado quando as proteínas anteriormente solubilizadas foram submetidas ao seu ponto isoelétrico, apresentaram aspecto diferente, conforme visualizado na Figura 19.

Figura 19 - Fotografias dos concentrados proteicos (A) CPC1 e (B) CPC2, esquerda (precipitados proteicos) e direita (concentrados proteicos úmidos)



Durante a produção dos concentrados observou-se uma diferença no modo de agregação e formação do precipitado. Nas placas observam-se os precipitados com aspecto diferente, onde o CPC1 (A) aparece na forma mais compacta comparado com o CPC2 (B), que possui um aspecto mais esfarelado. Assim, essas modificações estruturais podem alterar o modo em que as moléculas se agrupam quando expostas a diferentes valores de pH.

5.3. INFLUÊNCIA DO PROCESSO DE ISOLAMENTO DAS PROTEÍNAS NAS PROPRIEDADES FUNCIONAIS

As propriedades funcionais das proteínas são grandemente influenciadas pela sua conformação. A Tabela 4 apresenta os parâmetros obtidos do DSC, as características do gel e a capacidade de absorção de óleo do subproduto e dos produtos obtidos. Os valores das

temperaturas de desnaturação (T_d – Tabela 4) estavam acima de 100 °C para as amostras testadas, exceto o concentrado CPC2.

Tabela 4 - Características térmicas, formação de gel e capacidade de absorção de óleo do subproduto farinha de chia (CF), da fração rica em proteína (PRF), do concentrado proteico 1 (CPC1) e do concentrado proteico 2 (CPC2)

	CF	PRF	CPC1	CPC2
Caracterização térmica				
Temperatura média de desnaturação (ΔT_d) °C	66,4 – 152,72	130,3 – 145,2	32,0 – 145,7	47,3 – 129,8
Pico de temperatura de desnaturação (T_d) °C	115,8	135,4	107,7	95,1
Entalpia de desnaturação (ΔH_d) J g ⁻¹	151,4	68,1	109,3	104,9
Características do gel				
Menor concentração do gel m/v (%)	4	4	16	9
Firmeza do gel (mN)	2151,7 ± 0,28 ^a	2339,8 ± 0,49 ^a	2067,6 ± 0,87 ^a	748,6 ± 0,13 ^b
Capacidade de absorção do óleo (g g⁻¹)	3,5 ± 0,17 ^a	2,3 ± 0,06 ^b	3,2 ± 0,29 ^{a,b}	3,7 ± 0,28 ^a

Os resultados de firmeza do gel e de capacidade de absorção de óleo são expressos como média ± desvio padrão em triplicatas. Desvio padrão seguido de diferentes letras minúsculas na mesma linha apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).

O concentrado CPC1 apresentou uma T_d superior ao concentrado CPC2 (Tabela 4), provavelmente relacionado ao método de obtenção do concentrado CPC2 que utilizou uma temperatura de 90 °C, tornando a proteína parcialmente desnaturada. Estes resultados, aliado aos outros obtidos, demonstram o quão diferentes são as proteínas obtidas por diferentes métodos e que podem afetar a estabilidade das proteínas de chia. A fração PRF mostrou maior T_d e entalpia menor do que as amostras CF, CPC1 e CPC2 (Tabela 4), o que pode ser devido a uma maior proporção de conformações β -sheets nesta fração (Figura 16). Sandoval-Oliveros e Paredes-López (2013) encontraram resultados similares com T_d variando de 85,6 – 104,7 °C para as frações proteicas de chia e explicaram que é provável que a conformação dos componentes dessas frações seja estabilizada por uma série de interações hidrofóbicas, de natureza endotérmica e, portanto, requerem uma grande quantidade de energia para a desnaturação.

Essas diferenças na temperatura de desnaturação para diferentes proteínas podem ser atribuídas aos diferentes métodos de extração, bem como ao conteúdo de cinzas e proteínas. De fato, a maior estabilidade térmica das proteínas das lentilhas em comparação com os feijões comuns foi atribuída a um maior número de β -sheets (CARBONARO et al., 2008). De acordo com Sandoval-Oliveros e Paredes-López (2013), as temperaturas de desnaturação das frações de proteínas de chia foram semelhantes (albuminas = 103,6 °C e globulinas = 104,7 °C). Além disso, Olivos-Lugo, Valdivia-Lopez e Tecante (2010) estudaram a estabilidade térmica das frações proteicas de sementes de chia: albuminas (T_d = 80,1 °C), globulinas (T_d = 125 °C), glutelinas (T_d = 105 °C) e prolaminas (T_d = 70,4 °C).

A diferença de entalpia (ΔH) fornece informações sobre a energia necessária para desnaturar a estrutura proteica; Quanto maior este valor, maior é a sua estabilidade. O subproduto CF é o mais estável enquanto a fração PRF é a menos estável. Os concentrados CPC1 e CPC2 apresentaram valores semelhantes de entalpia. Estes resultados demonstram que a estabilidade ao calor das proteínas do subproduto CF é controlada por um equilíbrio de resíduos polares e não polares, de modo que quanto maior a proporção de resíduos não polares, maior é a estabilidade ao calor (HARWALKAR; MA, 1987). Devido à estabilidade térmica encontrada das proteínas de chia, elas podem ser usadas em sistemas de alimentos submetidos a tratamentos térmicos elevados.

A menor concentração de gelificação (LGC) é frequentemente utilizada como uma indicação da capacidade de gelificação das proteínas alimentares, que pode ser definida como a menor concentração requerida para formar um gel auto-sustentável. A LGC inferior indica uma capacidade superior da fração proteica de formar géis (BOYE et al., 2010). Os resultados mostraram que o concentrado CPC2 (com valor de LGC de 9%, m/v) formou um gel forte, indicando propriedades de gelificação superiores em relação ao concentrado CPC1 (com valor de LGC de 16%, m/v). Este resultado reforça os resultados obtidos para solubilidade proteica (Figura 20A), em que as amostras com elevada solubilidade requerem uma menor concentração de proteína para formar bons géis.

O concentrado CPC2 que foi obtido com a menor concentração de gelificação apresentou uma resistência do gel notavelmente inferior em comparação com o concentrado CPC1. Com efeito, estes resultados de LGC e solubilidade (Figura 20A) mostram que existe inter-relação e confirmam que o método de isolamento utilizado afeta as características destas proteínas. A firmeza do gel foi semelhante para o subproduto CF e fração PRF, mostrando ambos altas propriedades de gelificação. Portanto, recomenda-se estas matérias-primas (CF e PRF) para uso em alimentos que requerem propriedades de gelificação. Papalamprou et al.

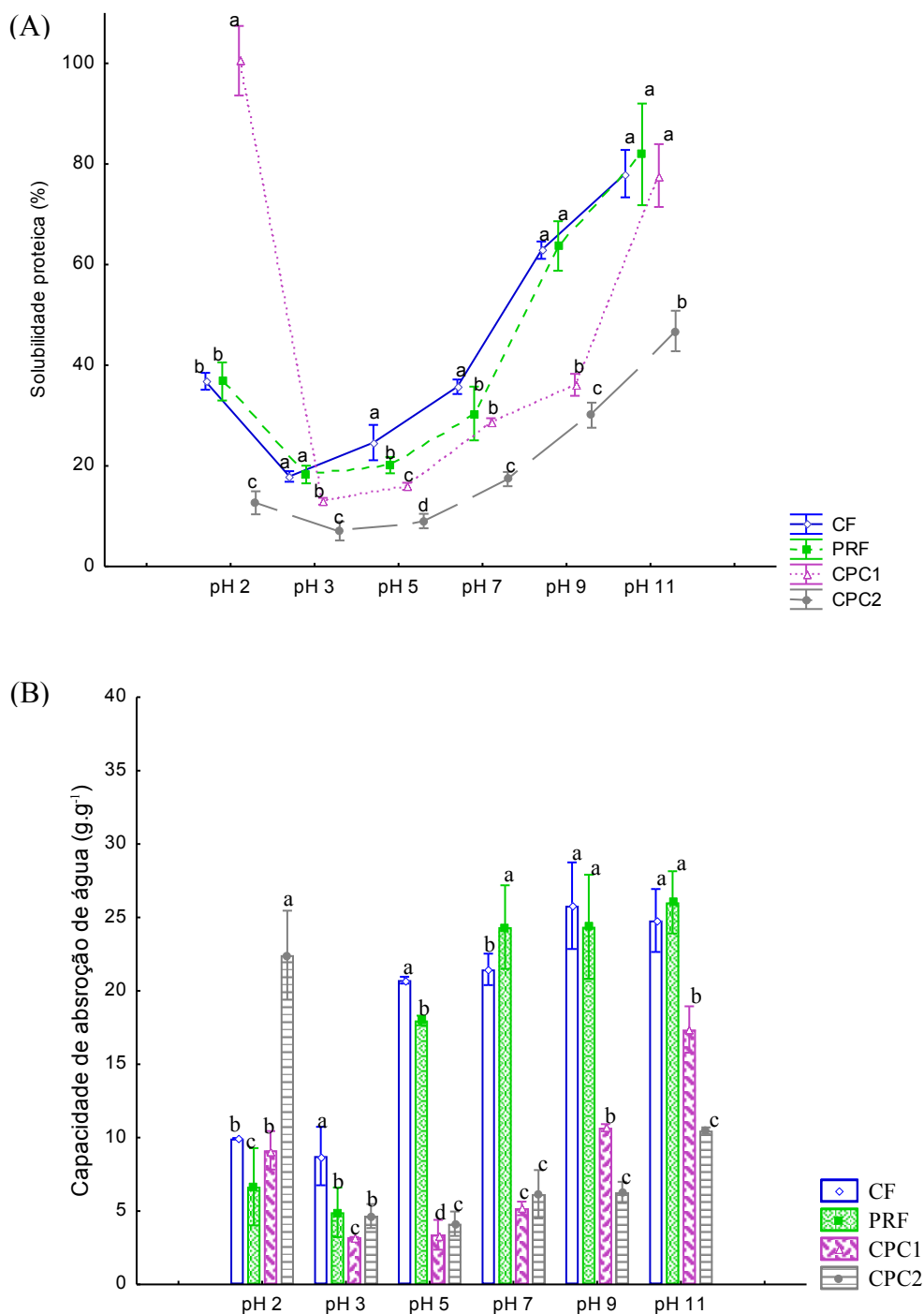
(2009) sugeriram que o método de isolamento, e não a sua composição, determina o comportamento de gelificação da proteína. O subproduto CF e a fração PRF apresentaram alto teor de fibras (21,4 e 5,0%, respectivamente), que favoreceu o LGC menor (4%, [m/m]). Isto ocorreu porque as sementes de chia possuem mucilagem que, em solução aquosa, forma um gel, mesmo em concentrações baixas de proteína (MUÑOZ et al., 2012). Este resultado é consistente com os nossos dados de composição (Tabela 2), o que mostra que o concentrado CPC2 (que tem um alto teor de proteína) requer uma menor concentração de proteína para formar géis, comparado ao concentrado CPC1. Joshi et al. (2011) explicaram que altas concentrações de proteína contribuem para formar redes de gel fortes devido a uma maior quantidade de agregações durante a etapa de formação do gel. Nosso resultado de gelificação do concentrado CPC2 é semelhante ao relatado por Joshi et al. (2011), que examinaram um isolado de proteína de lentilha convertido em pó por liofilização (630 mN) e secagem por pulverização (735 mN).

A capacidade de absorção de óleo (CAO) do concentrado CPC2 (Tabela 4) é semelhante à encontrada na proteína isolada da semente de chia (4,04 g de óleo por g de proteína) (OLIVOS-LUGO; VALDIVIA-LOPEZ; TECANTE, 2010). Ao comparar os concentrados CPC1 e CPC2, é provável que o passo de tratamento térmico da extração resultou em uma desnaturação parcial das proteínas, que teria exposto os sítios hidrofóbicos e disponibilizados para a interação com os lipídios. Isso poderia explicar o alto valor de CAO do concentrado CPC2. O alto valor de CAO do subproduto CF pode ser devido ao seu alto teor de fibras (Tabela 2). A fração rica em fibras de chia apresentou um valor de CAO de 2,02 g de óleo por g de amostra (VÁZQUEZ OVANDO et al., 2009), demonstrando que as fibras de chia também apresentam uma capacidade de absorção de óleo.

O tamanho da partícula pode influenciar a CAO em que partículas menores tenham relativamente maior superfície de contato e, portanto, teoricamente, poderão absorver mais óleo (LÓPEZ et al., 1996). Entretanto, o menor valor de CAO para a fração PRF em comparação com as outras proteínas isoladas sugere que ela tem uma natureza hidrofílica. O concentrado CPC2 apresentou capacidade de absorção de água menor (Figura 20B), mas um valor de CAO mais alto, indicando a presença de maior número de locais lipofílicos em sua estrutura do que as outras amostras de chia (CF, PRF e CPC1). Kinsella e Melachouris (1976) relataram que uma maior proporção de aminoácidos apolares nas proteínas resulta em características mais lipofílicas. O método utilizado para a obtenção das proteínas pode expor componentes lipofílicos (CHAU; HUANG, 2003). Neste estudo, a fração PRF extraída não foi exposta a nenhum processo químico e não exibiu comportamento lipofílico, enquanto que com a

utilização de um processo químico, utilizado para a obtenção dos concentrados CPC1 e CPC2, a CAO foi aumentada. O efeito do pH nas propriedades funcionais das proteínas de chia é apresentado nas Figuras 20, 21 e 22.

Figura 20 - Solubilidade proteica (A) e capacidade de absorção de água (B) do subproduto farinha (CF), fração rica em proteína (PRF), concentrado proteico 1 (CPC1) e concentrado proteico 2 (CPC2) de chia



Todos os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão em triplicata. Médias com letras minúsculas com o mesmo valor de pH são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Os valores de solubilidade (Figura 20A) das proteínas estudadas foram $CF > PRF > CPC1 > CPC2$. O subproduto CF e a fração PRF apresentaram solubilidade maior em praticamente todos os valores de pH estudados quando comparados aos concentrados CPC1 e CPC2. Em geral, a perda de solubilidade como resultado de aumentos de temperatura ou desnaturação térmica (Tabela 4) resulta em uma fraca solubilidade da proteína em solventes aquosos, como é observado no processo de produção do concentrado CPC2. Verifica-se assim, a perda de solubilidade dos concentrados devido possivelmente ao tratamento químico e ao calor que influenciam nesta característica das proteínas.

A perda de solubilidade no ponto isoelétrico é um critério clássico que é usado para detectar e monitorar a desnaturação de proteínas em soluções aquosas. Uma capacidade mínima de solubilidade e absorção de água (Figura 20) foi observada a pH 3 (isto é, o ponto isoelétrico das proteínas de chia), enquanto que a solubilidade aumentou tanto em valores de pH maiores e menores. Acima ou abaixo do ponto isoelétrico, em virtude do aumento das cargas líquidas e das forças repulsivas, as proteínas incham e ligam mais a água (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). As proteínas se agregam perto do ponto isoelétrico devido a fortes interações intermoleculares, resultando em menos interações da proteína com a água e, portanto, com uma menor solubilidade proteica (YULIANA et al., 2014).

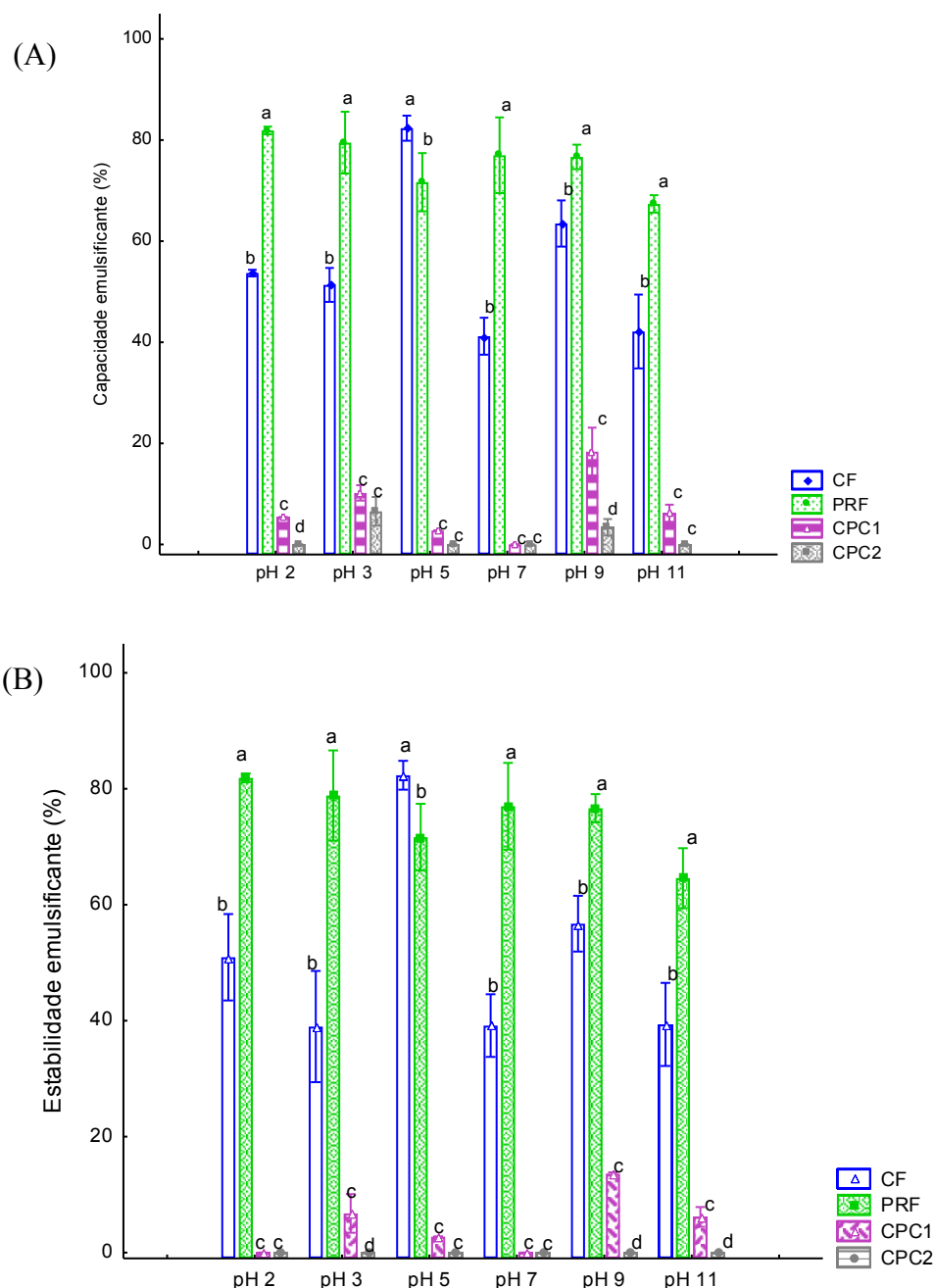
Maiores teores de fibras resultam em uma capacidade de absorção de água maior. Isso pode ser devido a presença de mucilagem no subproduto CF e fração PRF que podem atuar como fibras dietéticas solúveis. Este comportamento foi observado no subproduto CF e fração PRF que apresentam conteúdo de fibras superiores aos concentrados proteicos CPC1 e CPC2. As mucilagens possuem excelentes propriedades de capacidade de absorção de água (CAPITANI et al., 2012). Alguns autores estudaram a capacidade de absorção de água da mucilagem de chia ou fração rica em fibras: 62,64 – 143,66 g g⁻¹ (SEGURA-CAMPOS et al., 2014a), 11,73 g g⁻¹ (VÁZQUEZ-OVANDO et al., 2010) e 36,2 – 40,1 g g⁻¹ (SEGURA-CAMPOS et al., 2014b), demonstrando a alta capacidade destas frações.

Percebe-se que até o valor de pH 7, o concentrado CPC2 apresentou maior valor de capacidade de absorção de água comparado ao concentrado CPC1, onde provavelmente a proteína do concentrado CPC2 estava parcialmente desnaturada o que costuma aumentar cerca de 10% o valor de capacidade de absorção de água do que uma proteína nativa (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). Timilsena et al. (2016a) avaliaram a capacidade de absorção de água de três tipos de isolados proteicos de semente de chia seco por pulverização, à vácuo e liofilizado obtendo valores de 2,3; 2,1 e 2,9 g g⁻¹, reflexo do baixo teor

de fibras: 2,4; 2,5 e 2,2% e alto teor de proteínas: 90,5; 90,3 e 91,2%, respectivamente. Valores semelhantes ao encontrado neste estudo para os concentrados CPC1 e CPC2.

A Figura 21 apresenta a capacidade e estabilidade emulsificante das amostras de chia.

Figura 21 - Capacidade (A) e estabilidade (B) emulsificante do subproduto farinha (CF), fração rica em proteína (PRF), concentrado proteico 1 (CPC1) e concentrado proteico 2 (CPC2) de chia



Todos os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão em triplicata. Médias com letras minúsculas com o mesmo valor de pH são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

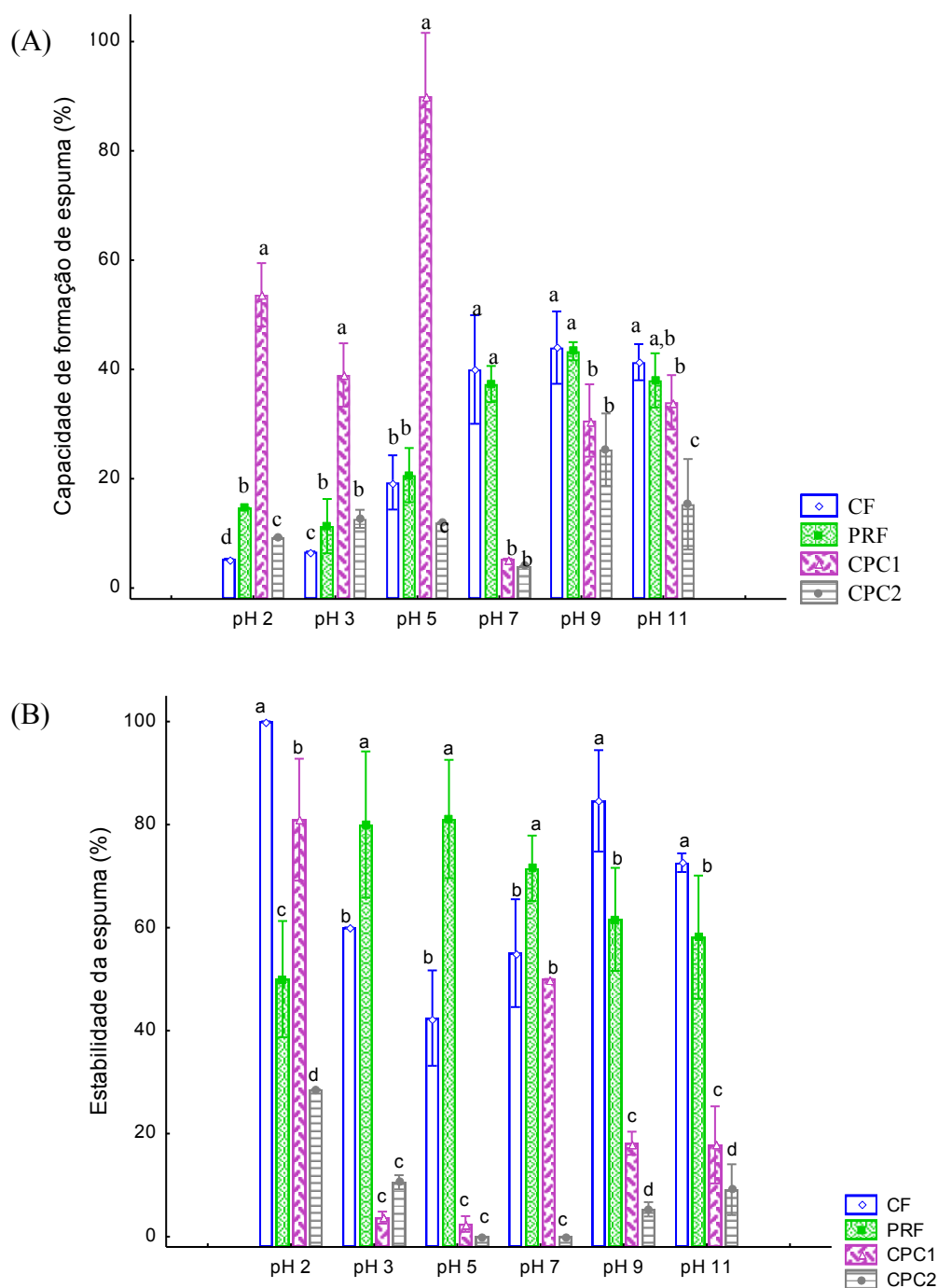
Em relação à capacidade e estabilidade emulsificante (Figura 21), a fração PRF e o subproduto CF ofereceram uma melhor formação e estabilidade da emulsão comparada aos concentrados CPC1 e CPC2, afirmando que as condições aplicadas no método químico de isolamento das proteínas alteram drasticamente esta propriedade. De fato, os concentrados CPC1 e CPC2 apresentaram quase nenhuma capacidade de emulsão, provavelmente devido às condições de extração da proteína, teor de proteína final e ao pH das emulsões.

Além disso, a alta temperatura usada durante a produção do concentrado CPC2 provavelmente resultam em desnaturação e insolubilidade das proteínas, afetando também suas propriedades emulsificantes. Uma dependência da capacidade emulsificante em função do pH era esperada, uma vez que se sabe que a capacidade de emulsão da proteína depende do seu equilíbrio hidrofílico-lipofílico, que é afetado pelo pH (SATHE; DESHPANDE; SALUNKHE, 1982).

A Figura 22 apresenta a capacidade e estabilidade de formação de espuma das proteínas de chia. Para a capacidade de formação de espuma (Figura 22A), o subproduto CF e a fração PRF apresentaram resultados semelhantes, enquanto que os concentrados CPC1 e CPC2 apresentaram diferenças. A capacidade mínima de espuma ocorre a pH 3 (Figura 22A), devido ao comportamento das proteínas em seu ponto isoelétrico (Figura 20A). O concentrado CPC1 apresentou alta capacidade de formação de espuma (Figura 22A), mas baixa estabilidade (Figura 22B). Makri e Doxastakis (2006) observaram que o pH altera a estrutura da proteína, levando a diferenças na capacidade e estabilidade da espuma.

A alta solubilidade em proteínas é um pré-requisito para alcançar uma boa capacidade e estabilidade de espuma. Os concentrados apresentaram baixo valor de solubilidade e, portanto, baixa capacidade de formação de espuma. Entretanto, o concentrado CPC1 apresentou alta formação e estabilidade comparado com o concentrado CPC2. A fração PRF foi aproximadamente 80% estável para todos os valores de pH após a formação da emulsão. Os concentrados apresentaram baixa estabilidade após a formação das emulsões, indicando que as diferenças na atividade emulsificante das proteínas também poderiam ser causadas por diferenças estruturais.

Figura 22 - Capacidade (A) e estabilidade (B) de formação de espuma do subproduto farinha (CF), fração rica em proteína (PRF), concentrado proteico 1 (CPC1) e concentrado proteico 2 (CPC2) de chia



Todos os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão em triplicata. Médias com letras minúsculas com o mesmo valor de pH são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

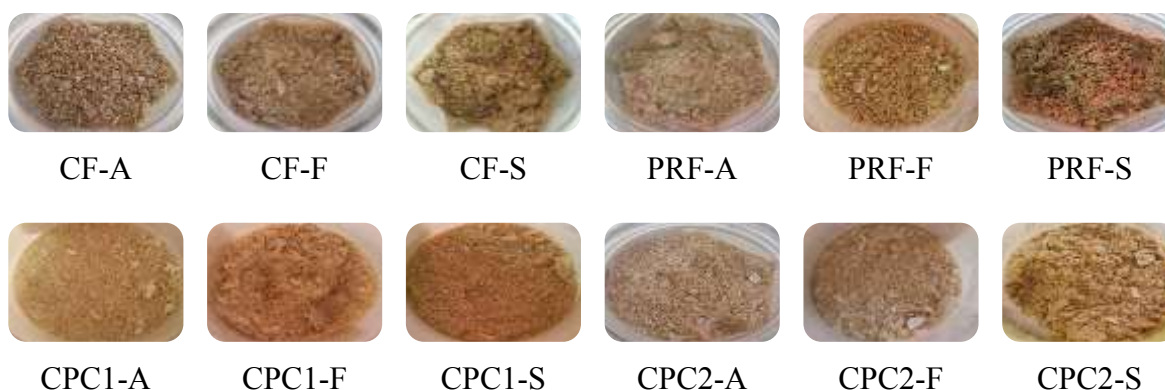
Assim, avaliando os resultados da caracterização das proteínas de chia, comprovou-se que os diferentes métodos utilizados para extração da proteína modificaram as suas

propriedades. Então, buscamos testar se o método de processamento afeta as bioatividades dos hidrolisados obtidos a partir dessas proteínas.

5.4. HIDRÓLISE PROTEICA PARA A OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS

O mesmo tempo de hidrólise - 240 min - foi determinado para avaliar o efeito das enzimas nas bioatividades dos hidrolisados e das frações peptídicas. A atividade específica determinada nas proteases foi de 9 U mg^{-1} para a enzima Alcalase e $2,76 \text{ U mg}^{-1}$ para a enzima Flavourzyme. A Figura 23 apresenta as fotografias dos hidrolisados proteicos obtidos após o processo de liofilização.

Figura 23 - Fotografias dos hidrolisados proteicos obtidos a partir do subproduto farinha (CF), fração rica em proteína (PRF), concentrado proteico 1 (CPC1) e concentrado proteico 2 (CPC2) de chia



A: Alcalase; F: Flavourzyme; S: Sequencial

A Tabela 5 apresenta os valores de grau de hidrólise (GH) para os diferentes métodos de extração de proteínas e os rendimentos das frações de ultrafiltração. Em geral, os hidrolisados dos concentrados CPC2 e CPC1 apresentaram valores de GH maiores do que os hidrolisados do subproduto CF e da fração PRF, comprovando que, em geral, os concentrados são bons materiais para hidrólise, por facilitarem o processo de hidrólise. Em relação aos sistemas enzimáticos utilizados, a Alcalase produziu hidrolisados com maior GH do que a Flavourzyme. Em 120 min de hidrólise, Betancur-Ancona et al. (2014) também encontraram resultados semelhantes, para hidrolisado de concentrado de proteína de feijão – 33,29% utilizando o sistema sequencial Alcalase-Flavourzyme. Zhao et al. (2012b), em 240 min de hidrólise, encontraram valor de GH mais elevados para Alcalase (GH: 14,51%) e mais baixo

para Flavourzyme (GH: 2,95%) para hidrolisados de proteínas de arroz. Isso sugere que os locais catalíticos mais suscetíveis para hidrólise estejam mais disponíveis para Alcalase do que para a Flavourzyme.

Tabela 5 - Grau de hidrólise (GH) por três sistemas enzimáticos e rendimento (%) dos hidrolisados proteicos do subproduto farinha (CF), fração rica em proteína (PRF), concentrado proteico 1 (CPC1) e concentrado proteico 2 (CPC2) de chia, resultantes da ultrafiltração

		Rendimento (%)		
Alcalase	GH (%)	F1	F2	F3
CF	18,69 ± 0,273 ^d	52,0 ± 7,97 ^{c,d,e}	11,71 ± 3,58 ^{c,d,e,f}	36,27 ± 4,39 ^{c,d}
PRF	20,32 ± 1,801 ^d	63,13 ± 3,53 ^{b,c}	5,54 ± 1,09 ^{e,f}	31,32 ± 2,43 ^{d,e}
CPC1	30,61 ± 0,771 ^b	41,48 ± 6,55 ^{e,f}	4,07 ± 2,09 ^f	54,45 ± 4,45 ^a
CPC2	29,33 ± 0,514 ^b	35,08 ± 2,09 ^{f,g}	14,38 ± 2,38 ^{a,b,c,d,e}	50,53 ± 4,46 ^{a,b}
Flavourzyme	GH (%)	F1	F2	F3
CF	7,96 ± 0,273 ^e	73,12 ± 3,62 ^{a,b}	5,09 ± 4,79 ^{e,f}	21,79 ± 1,37 ^{e,f}
PRF	5,44 ± 0,236 ^f	79,06 ± 2,35 ^a	17,43 ± 2,43 ^{a,b,c}	3,50 ± 0,07 ^g
CPC1	6,78 ± 0,273 ^{e,f}	59,39 ± 5,42 ^{b,c,d}	17,97 ± 8,09 ^{a,b,c}	22,63 ± 2,68 ^{e,f}
CPC2	5,79 ± 0,118 ^{e,f}	69,81 ± 7,46 ^{a,b}	12,49 ± 1,08 ^{b,c,d,e,f}	17,70 ± 6,37 ^f
Sequencial	GH (%)	F1	F2	F3
CF	23,21 ± 1,425 ^c	45,79 ± 2,79 ^{d,e,f}	8,03 ± 0,28 ^{d,e,f}	46,17 ± 2,51 ^{a,b,c}
PRF	25,03 ± 0,273 ^c	34,11 ± 1,11 ^{f,g}	21,65 ± 1,66 ^{a,b}	44,22 ± 2,77 ^{a,b,c}
CPC1	39,70 ± 0,473 ^a	40,44 ± 3,32 ^{e,f}	18,41 ± 2,13 ^{a,b,c}	41,14 ± 5,45 ^{b,c,d}
CPC2	38,99 ± 0,946 ^a	25,81 ± 4,13 ^g	23,78 ± 2,56 ^a	50,41 ± 6,69 ^{a,b}

Média ± desvio padrão; desvio padrão seguidos de letras minúsculas diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes ($p < 0,05$). F1, fração 1: representa as frações peptídicas de tamanho molecular > 10 kDa; F2, fração 2: representa as frações peptídicas de tamanho molecular 3-10 kDa; e F3, fração 3: representa as frações peptídicas de tamanho molecular < 3 kDa.

A Alcalase, uma endoprotease bacteriana, é limitada pela sua especificidade, resultando em GH não superior a 20-25%, dependendo do substrato, mas pode atingir estes valores em um curto período de tempo, sob condições moderadas (SEGURA-CAMPOS et al., 2013). A Flavourzyme apesar de apresentar baixo valor de GH é recomendada pela literatura porque produz hidrolisados ou peptídeos com atividade biológica e baixa amargura. No presente estudo, utilizou-se também o sistema sequencial Alcalase-Flavourzyme, pois a pré-digestão com a endoprotease Alcalase aumenta o número de sítios N-terminal disponíveis, o que facilita

a hidrólise pela exopeptidase Flavourzyme, podendo gerar valores de GH tão altos quanto 50% (PEDROCHE et al., 2002). Os valores de GH mais elevados foram produzidos com o sistema sequencial. Espera-se que uma combinação de duas enzimas leva a um produto mais hidrolisado do que usar somente uma enzima, conforme relatado por García-Moreno et al. (2014) e Shi et al. (2014).

O valor de GH dos hidrolisados dos concentrados CPC1 e CPC2 nos três sistemas enzimáticos foram estatisticamente iguais ($p < 0,05$); observou-se que a variação do método de obtenção dos concentrados proteicos de chia não produziu melhora significativa no valor de GH. Como a Flavourzyme tem atividade endo e exopeptidase, a expectativa era de que a predigestão com Alcalase aumentasse o número de locais N-terminais, facilitando assim a hidrólise (KOU et al., 2013). Segura-Campos et al. (2013) realizaram hidrólise da fração PRF e obtiveram um valor de GH de 43,8% utilizando o sistema sequencial Alcalase-Flavourzyme, resultado maior que o encontrado neste estudo, provavelmente porque o teor de lipídios da fração PRF (0,54%) era inferior ao de nosso estudo (16,2%), o que indicou ser um interferente para obtenção de GH maior dos hidrolisados proteicos.

Os rendimentos das frações de hidrolisados proteicos (Tabela 5) após a ultrafiltração mostram que os menores valores de GH apresentados pela enzima Flavourzyme correspondem a um maior conteúdo de peptídeos com tamanhos > 10 kDa. Os valores de GH mais elevados apresentados pelo sistema sequencial Alcalase-Flavourzyme correspondem a um maior conteúdo de peptídeos com tamanhos < 3 kDa. Assim, a distribuição das massas moleculares dos hidrolisados proteicos obtidos por diferentes sistemas enzimáticos são visivelmente distintas, refletindo diferenças nos comprimentos das cadeias peptídicas e na exposição de grupos amino terminais, o que pode influenciar grandemente a atividade biológica dos hidrolisados. Isso sugere alta eficiência dos sistemas Alcalase e sequencial Alcalase-Flavourzyme usados para hidrolisar a chia em peptídeos de menor tamanho molecular.

5.5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DOS PEPTÍDEOS DE CHIA

Sabe-se que peptídeos de baixa MM exercem atividades antioxidantes maiores do que peptídeos de alta MM, geralmente com MM acima de 3 kDa (GARCIA-MORA et al., 2015; ZHOU; SUN; CANNING, 2012). Uma vez que a atividade antioxidante varia frequentemente em função de diferentes radicais livres, inicialmente o estudo do sequestro do radical livre

DPPH foi utilizado como medida para avaliar a atividade antioxidante dos hidrolisados e frações peptídicas, conforme apresentado na Tabela 6.

Tabela 6 - EC50 para DPPH de hidrolisados e frações peptídicas do subproduto farinha (CF), fração rica em proteína (PRF), concentrado proteico 1 (CPC1) e concentrado proteico 2 (CPC2) de chia

Hidrolisado/Frações peptídicas	mg hidrolisado/fração peptídica g ⁻¹ DPPH	Hidrolisado/Frações peptídicas	mg hidrolisado/fração peptídica g ⁻¹ DPPH
CPC1-A	55,83 ± 0,43 ^{m,n,o,p,q,r}	CF-A	52,1 ± 1,37 ^{n,o,p,q,r,s,t}
CPC1-A F1	83,5 ± 1,59 ^{e,f,g,h}	CF-A F1	34,6 ± 1,24 ^{t,u,v,x}
CPC1-A F2	16,8 ± 5,37 ^z	CF-A F2	127,6 ± 2,67 ^{b,c,d}
CPC1-A F3	45,9 ± 1,03 ^{p,q,r,s,t,u}	CF-A F3	33,4 ± 0,95 ^{u,v,x}
CPC1-F	54,6 ± 1,49 ^{m,n,o,p,q,r}	CF-F	65,7 ± 0,25 ^{i,j,l,m,n,o}
CPC1-F F1	54,7 ± 5,65 ^{m,n,o,p,q,r}	CF-F F1	61,8 ± 2,92 ^{l,m,n,o,p}
CPC1-F F2	34,8 ± 1,64 ^{s,t,u,v,x}	CF-F F2	42,5 ± 3,80 ^{q,r,s,t,u}
CPC1-F F3	28,3 ± 1,68 ^{v,x,z}	CF-F F3	54,7 ± 0,58 ^{m,n,o,p,q,r}
CPC1-S	74,0 ± 0,62 ^{g,h,i,j,l}	CF-S	94,1 ± 2,81 ^{e,f}
CPC1-S F1	147,8 ± 1,35 ^b	CF-S F1	52,8 ± 0,61 ^{n,o,p,q,r,s}
CPC1-S F2	79,3 ± 8,15 ^{f,g,h,i,j}	CF-S F2	55,4 ± 0,90 ^{m,n,o,p,q,r}
CPC1-S F3	198,7 ± 0,99 ^a	CF-S F3	66,9 ± 2,20 ^{i,j,l,m,n,o}
CPC2-A	75,1 ± 0,90 ^{g,h,i,j,l}	PRF-A	70,9 ± 2,78 ^{h,i,j,l,m,n}
CPC2-A F1	85,9 ± 2,84 ^{e,f,g}	PRF-A F1	49,0 ± 1,06 ^{o,p,q,r,s,t,u}
CPC2-A F2	44,5 ± 0,20 ^{p,q,r,s,t,u}	PRF-A F2	170,7 ± 13,54 ^a
CPC2-A F3	102,5 ± 1,57 ^e	PRF-A F3	20,3 ± 0,78 ^{x,z}
CPC2-F	125,8 ± 3,40 ^d	PRF-F	127,9 ± 5,00 ^{c,d}
CPC2-F F1	147,9 ± 5,44 ^b	PRF-F F1	74,5 ± 1,66 ^{g,h,i,j,l}
CPC2-F F2	40,85 ± 1,03 ^{r,s,t,u,v}	PRF-F F2	59,8 ± 3,51 ^{l,m,n,o,p,q}
CPC2-F F3	58,66 ± 1,48 ^{l,m,n,o,p,q,r}	PRF-F F3	35,8 ± 0,19 ^{s,t,u,v}
CPC2-S	145,3 ± 9,41 ^{b,c}	PRF-S	83,1 ± 3,74 ^{f,g,h,i}
CPC2-S F1	57,3 ± 1,07 ^{l,m,m,o,p,q,r}	PRF-S F1	71,2 ± 4,41 ^{g,h,i,j,l,m}
CPC2-S F2	33,4 ± 1,02 ^{u,v,x}	PRF-S F2	64,3 ± 0,98 ^{j,l,m,n,o}
CPC2-S F3	140,1 ± 3,16 ^{b,c,d}	PRF-S F3	68,3 ± 0,45 ^{g,h,i,j,l,m,n}

Média ± desvio padrão; desvio padrão seguidos de letras minúsculas diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes (p < 0,05). Fração 1, F1, representa as frações peptídicas de tamanho molecular > 10 kDa; fração 2, F2, representa as frações peptídicas de tamanho molecular 3-10 kDa; e fração 3, F3, representa as frações peptídicas de tamanho molecular < 3 kDa.

A concentração necessária para obter um efeito antioxidante a 50% (EC50) é um parâmetro normalmente empregado para expressar a capacidade antioxidante e comparar a atividade de compostos diferentes (CHEN; BERTIN; FROLDI, 2013). A capacidade de sequestro do radical livre DPPH para os hidrolisados e frações peptídicas de chia variaram de maneira significativa entre 16,8 e 198,7 mg hidrolisado/fração peptídica g⁻¹ DPPH. Curiosamente, os hidrolisados CPC1-A F2 e PRF-A F3 mostraram a atividade de sequestro do radical DPPH mais forte enquanto os hidrolisados CPC1-S F3 e PRF-A F2 foram menos eficazes contra DPPH, o que demonstra que o sistema enzimático e consequentemente, o grau de hidrólise alcançado nos hidrolisados proteicos de chia, afeta a efetividade da atividade antioxidante. De fato, entre as frações, o fracionamento por ultrafiltração afetou a atividade de sequestro do radical DPPH. As frações peptídicas com menores tamanhos moleculares apresentaram maiores valores de atividade antioxidante.

Em geral, as frações F2 (frações peptídicas de MM entre 3-10 kDa) e F3 (frações peptídicas de MM < 3 kDa) apresentaram a maior atividade antioxidante em comparação com os hidrolisados e frações F1 (frações peptídicas de MM > 10 kDa) de chia. As amostras que obtiveram os melhores resultados para o DPPH foram utilizando a Flavourzyme (concentrado CPC1-F, F3 e fração PRF-F, F3) e Alcalase (concentrado CPC1-A, F2). Além disso, percebe-se que a matéria-prima, utilizada para produzir os hidrolisados proteicos, afeta o resultado para a atividade antioxidante: utilizando os concentrados CPC1 e CPC2 como matérias-primas para a hidrólise, as melhores respostas foram obtidas nas frações peptídicas de MM entre 3-10 kDa, enquanto que para a fração PRF e o subproduto CF, a fração peptídica < 3 kDa apresentou melhor resultado, ou seja, menor concentração de hidrolisado/fração peptídica por grama de DPPH. Isto pode ser atribuído ao fato de que os peptídeos com MM inferior poderiam reagir mais facilmente com os radicais livres.

Outros autores também verificaram que a atividade das frações de peptídeos com menor MM (< 3 kDa) foi mais forte para hidrolisados proteicos de batata (ZHANG; MU, 2017; ZHANG; MU; SUN, 2014). Alguns autores estudaram a atividade antioxidante de hidrolisado proteico de farelo de arroz (PHONGTHAI et al., 2018) e amendoim (HWANG et al., 2010) pelo método DPPH e verificaram que os peptídeos com MM < 3 kDa e entre 3-5 kDa apresentaram as maiores atividades antioxidantes. No entanto, as diferenças na composição, estrutura e comprimento de aminoácidos dos peptídeos nos hidrolisados podem ser os principais fatores que influenciam a atividade antioxidante (KLOMPONG et al., 2007; PIHLANTO; AKKANEN; KORHONEN, 2008; WANG et al., 2007; YANG et al., 2008). Os resultados indicaram que a eficácia antioxidante dos hidrolisados proteicos de chia dependerá do tipo de

enzima e da matéria-prima. A segunda medida de atividade antioxidante, a atividade de captura do radical livre ABTS⁺, é apresentada na Tabela 7.

Tabela 7 - Atividade antioxidante por captura do radical livre ABTS⁺ de hidrolisados e frações peptídicas do subproduto farinha (CF), fração rica em proteína (PRF), concentrado proteico 1 (CPC1) e concentrado proteico 2 (CPC2) de chia

Hidrolisado/Frações peptídicas	μmol Trolox L ⁻¹ g ⁻¹ hidrolisado/fração	Hidrolisado/Frações peptídicas	μmol Trolox L ⁻¹ g ⁻¹ hidrolisado/fração
CPC1-A	438,5 ± 30,21 ^{q,r,s}	CF-A	1976,2 ± 24,89 ^h
CPC1-A F1	3099,1 ± 79,21 ^d	CF-A F1	1042,8 ± 10,63 ^{m,n}
CPC1-A F2	172,6 ± 11,83 ^{u,v}	CF-A F2	545,9 ± 17,39 ^{p,q}
CPC1-A F3	175,3 ± 15,84 ^{u,v}	CF-A F3	666,9 ± 104,46 ^{o,p}
CPC1-F	1232,6 ± 2,70 ^{l,m}	CF-F	2441,5 ± 5,65 ^{f,g}
CPC1-F F1	2555,5 ± 6,67 ^{e,f}	CF-F F1	2660,3 ± 32,81 ^{d,e}
CPC1-F F2	171,0 ± 15,41 ^{u,v}	CF-F F2	288,1 ± 57,10 ^{f,s,t,u}
CPC1-F F3	307,9 ± 6,70 ^{r,s,t,u}	CF-F F3	2767,9 ± 113,35 ^d
CPC1-S	812,9 ± 82,14 ^o	CF-S	1045,1 ± 71,72 ⁿ
CPC1-S F1	276,4 ± 4,39 ^{s,t,u}	CF-S F1	1338,1 ± 42,08 ^{j,l}
CPC1-S F2	25,4 ± 8,28 ^v	CF-S F2	229,1 ± 28,49 ^{t,u}
CPC1-S F3	146,0 ± 3,91 ^{u,v}	CF-S F3	391,0 ± 30,96 ^{q,r,s,t}
CPC2-A	307,2 ± 22,07 ^{r,s,t,u}	PRF-A	3517,6 ± 96,61 ^c
CPC2-A F1	1182,6 ± 9,38 ^{l,m,n}	PRF-A F1	1432,6 ± 32,67 ^j
CPC2-A F2	554,3 ± 34,16 ^{p,q}	PRF-A F2	4409,0 ± 39,79 ^a
CPC2-A F3	185,0 ± 9,12 ^{u,v}	PRF-A F3	4551,8 ± 32,15 ^a
CPC2-F	1282,6 ± 34,11 ^{j,l,m}	PRF-F	3405,5 ± 50,65 ^c
CPC2-F F1	1964,6 ± 103,53 ^h	PRF-F F1	1746,2 ± 63,88 ⁱ
CPC2-F F2	438,7 ± 18,93 ^{q,r,s}	PRF-F F2	761,8 ± 28,97 ^o
CPC2-F F3	732,6 ± 38,70 ^o	PRF-F F3	1256,7 ± 4,03 ^{j,l,m}
CPC2-S	682,2 ± 82,18 ^{o,p}	PRF-S	2369,9 ± 58,45 ^g
CPC2-S F1	2494,2 ± 223,36 ^{e,f,g}	PRF-S F1	3835,2 ± 112,65 ^b
CPC2-S F2	197,2 ± 4,86 ^{t,u}	PRF-S F2	701,0 ± 56,57 ^{o,p}
CPC2-S F3	460,6 ± 19,13 ^{q,r}	PRF-S F3	754,2 ± 7,91 ^o

Média ± desvio padrão; desvio padrão seguidos de letras minúsculas diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes (p < 0,05). F1, fração 1: representa as frações peptídicas de tamanho molecular > 10 kDa; F2, fração 2: representa as frações peptídicas de tamanho molecular 3-10 kDa; e F3, fração 3: representa as frações peptídicas de tamanho molecular < 3 kDa.

Pelo método de captura do radical livre ABTS⁺, a enzima Alcalase (PRF-A F2 e F3) se comportou melhor, seguido pelo sistema sequencial Alcalase-Flavourzyme (PRF-S F1) e Flavourzyme (PRF-F). Phongthai et al. (2018) também verificaram que os peptídeos com MM menores (< 3 kDa e 3-5 kDa) apresentaram maior atividade ($425,81 \pm 2,59$ e $430,12 \pm 1,95$ μmol de equivalente Trolox g^{-1} amostra, respectivamente) do que os peptídeos maiores (5-10 kDa; $403,28 \pm 4,90$ μmol de equivalente Trolox g^{-1} amostra). Entretanto, avaliando de um modo geral os resultados, pela atividade de captura do radical livre ABTS⁺, verificou-se que a fração F1 com maior MM (> 10 kDa) foi a que apresentou melhores resultados. A maior atividade dessa fração poderia estar relacionada com o efeito sinérgico de peptídeos deste tamanho molecular.

A enzima utilizada afeta o tamanho do peptídeo e os aminoácidos específicos contidos na sequência peptídica influenciando a atividade antioxidante (LAPSONGPHON; YONGSAWATDIGUL, 2013). O aminoácido com um grupo hidroxilo fenólico nos peptídeos também pode ser responsável pela atividade de captura do radical livre ABTS⁺. A especificidade da enzima desempenha um papel importante na liberação de mais compostos fenólicos e/ou na exposição de aminoácidos antioxidantes e na subsequente expressão de sua atividade antioxidante. Além disso, a semente de chia contém uma quantidade de compostos com potente atividade antioxidante devido a substâncias como miricetina, quercetina, kaempferol e ácido cafeico (COELHO; SALAS-MELLADO, 2014). Como já relatado, é possível que na extração de concentrados alguns compostos fenólicos podem ter co-precipitado com as proteínas e permaneceram presentes nos hidrolisados proteicos.

A maior atividade do ABTS⁺ para hidrolisados utilizando Alcalase em comparação com a atividade dos produtos obtidos com outras enzimas é confirmada na literatura. A Alcalase produziu peptídeos de proteínas de canola capazes de captura do radical livre ABTS⁺ mais eficazmente do que os obtidos com Pancreatina, Tripsina e Pepsina (ALASHI et al., 2014), o que também ocorreu no caso de proteínas de linhaça tratadas com esta enzima (KARAMACÍ; KOSIŃSKA-CAGNAZZO; KULCZYK, 2016).

A atividade antioxidante dos peptídeos pode ser influenciada pela sequência de seus aminoácidos, a quantidade dos aminoácidos presentes, o grau de hidrólise e o tamanho dos peptídeos (INTARASIRISAWAT et al., 2012). Assim como pelos métodos de DPPH e ABTS, no método do FRAP os hidrolisados/frações peptídicas foram principalmente afetados pela especificidade da enzima e o grau de hidrólise como mostrado na Tabela 8. Para o método de FRAP obtiveram melhor resultado: Alcalase (subproduto CF-A F2, fração PRF-A F2),

Flavourzyme (concentrado CPC1-F F2, F3) e Sequencial Alcalase-Flavourzyme (subproduto CF-S F2).

Tabela 8 - Atividade antioxidante por FRAP de hidrolisados e frações peptídicas do subproduto farinha (CF), fração rica em proteína (PRF), concentrado proteico 1 (CPC1) e concentrado proteico 2 (CPC2) de chia

Hidrolisado/Fração peptídica	$\mu\text{mol FeSO}_4 \text{ g}^{-1}$ hidrolisado/fração peptídica	Hidrolisado/Fração peptídica	$\mu\text{mol FeSO}_4 \text{ g}^{-1}$ hidrolisado/fração peptídica
CPC1-A	$214,8 \pm 1,45^{\text{m,n,o,p}}$	CF-A	$279,1 \pm 9,40^{\text{i,j,l}}$
CPC1-A F1	$177,9 \pm 6,37^{\text{o,p,q,r,s,t}}$	CF-A F1	$247,3 \pm 12,27^{\text{j,l,m,n}}$
CPC1-A F2	$315,3 \pm 4,40^{\text{i,j,l}}$	CF-A F2	$420,3 \pm 10,95^{\text{a}}$
CPC1-A F3	$211,7 \pm 0,89^{\text{m,n,o,p,q}}$	CF-A F3	$366,1 \pm 4,43^{\text{b,c,d,e,f}}$
CPC1-F	$180,7 \pm 5,18^{\text{o,p,q,r,s}}$	CF-F	$183,3 \pm 4,31^{\text{o,p,q,r,s}}$
CPC1-F F1	$165,6 \pm 10,55^{\text{q,r,s,t,u}}$	CF-F F1	$214,1 \pm 16,37^{\text{m,n,o,p}}$
CPC1-F F2	$384,6 \pm 4,30^{\text{a,b,c,d}}$	CF-F F2	$309,7 \pm 4,27^{\text{g,h,i}}$
CPC1-F F3	$377,3 \pm 7,67^{\text{a,b,c,d,e}}$	CF-F F3	$277,9 \pm 6,66^{\text{i,j,l}}$
CPC1-S	$181,5 \pm 2,97^{\text{o,p,q,r,s}}$	CF-S	$244,8 \pm 7,09^{\text{l,m,n}}$
CPC1-S F1	$176,3 \pm 8,13^{\text{p,q,r,s,t,u}}$	CF-S F1	$295,3 \pm 11,71^{\text{h,i,j}}$
CPC1-S F2	$308,5 \pm 26,53^{\text{g,h,i}}$	CF-S F2	$398,6 \pm 9,50^{\text{a,b,c}}$
CPC1-S F3	$189,1 \pm 2,56^{\text{o,p,q,r,s}}$	CF-S F3	$319,9 \pm 17,00^{\text{f,g,h,i}}$
CPC2-A	$150,7 \pm 2,94^{\text{s,t,u}}$	PRF-A	$289,6 \pm 3,64^{\text{h,i,j,l}}$
CPC2-A F1	$173,6 \pm 12,59^{\text{p,q,r,s,t,u}}$	PRF-A F1	$252,5 \pm 16,36^{\text{j,l,m}}$
CPC2-A F2	$335,6 \pm 16,84^{\text{e,f,g,h}}$	PRF-A F2	$412,2 \pm 9,73^{\text{a,b}}$
CPC2-A F3	$155,6 \pm 10,69^{\text{f,s,t,u}}$	PRF-A F3	$370,7 \pm 2,78^{\text{b,c,d,e}}$
CPC2-F	$131,3 \pm 3,82^{\text{t,u,v}}$	PRF-F	$203,8 \pm 13,07^{\text{n,o,p,q,r}}$
CPC2-F F1	$129,7 \pm 7,22^{\text{u,v}}$	PRF-F F1	$213,3 \pm 16,76^{\text{m,n,o,p,q}}$
CPC2-F F2	$292,1 \pm 23,22^{\text{h,i,j,l}}$	PRF-F F2	$351,5 \pm 5,77^{\text{c,d,e,f,g}}$
CPC2-F F3	$257,3 \pm 9,59^{\text{j,l,m}}$	PRF-F F3	$333,2 \pm 10,90^{\text{e,f,g,h}}$
CPC2-S	$129,5 \pm 9,64^{\text{u,v}}$	PRF-S	$225,8 \pm 11,55^{\text{m,n,o}}$
CPC2-S F1	$162,5 \pm 11,99^{\text{r,s,t,u}}$	PRF-S F1	$319,6 \pm 8,48^{\text{f,g,h,i}}$
CPC2-S F2	$283,9 \pm 18,25^{\text{i,j,l}}$	PRF-S F2	$350,1 \pm 5,69^{\text{d,e,f,g}}$
CPC2-S F3	$92,6 \pm 10,91^{\text{v}}$	PRF-S F3	$220,8 \pm 6,09^{\text{m,n,o,p}}$

Média $\pm$ desvio padrão; desvio padrão seguidos de letras minúsculas diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes ($p < 0,05$). F1, fração 1: representa as frações peptídicas de tamanho molecular > 10 kDa; F2, fração 2: representa as frações peptídicas de tamanho molecular 3-10 kDa; e F3, fração 3: representa as frações peptídicas de tamanho molecular < 3 kDa.

O aumento de aminoácidos livres e fragmentos de peptídeos proporcionam uma fonte adicional de elétrons e prótons para manter um alto potencial redox (XIAO et al., 2014). Phongthai et al. (2018) obtiveram o maior valor de FRAP ($125,09 \pm 1,45 \mu\text{mol FeSO}_4 \text{ g}^{-1}$ amostra) em hidrolisado proteico de farelo de arroz hidrolisado com o sistema Pepsina-Tripsina. Este foi seguido por Pepsina ($109,82 \pm 1,96 \mu\text{mol FeSO}_4 \text{ g}^{-1}$ amostra), enquanto o concentrado proteico de farelo de arroz teve o menor valor de $78,84 \pm 7,09 \mu\text{mol FeSO}_4 \text{ g}^{-1}$ amostra, resultados inferiores aos encontrados no presente estudo.

O FRAP e a atividade de captura do radical ABTS^+ são típicos dos métodos de transferência de elétrons envolvendo uma reação redox. No entanto, o tipo de radical e o mecanismo de reação entre eles são diferentes. O FRAP indica o potencial de redução de um antioxidante que reage com complexo Fe^{3+} -TPTZ produzindo um composto azul de Fe^{2+} -TPTZ. O poder de redução está associado à presença dos compostos atuando como um doador de átomos de hidrogênio para estabilizar os radicais livres (WANYO; CHOMNAWANG; SIRIAMORNPUN, 2009). ABTS^+ , o oxidante no ensaio ABTS, também fornece composto de cor verde. A extensão da descoloração como percentual de inibição da capacidade radical ou de captura (RE et al., 1999). O FRAP é conduzido sob condições de pH ácido (pH 3,6) de modo a manter a solubilidade em ferro enquanto que o ABTS é conduzido a pH 7,4. Estas poderiam ser as razões para a não correlação entre os métodos FRAP e ABTS.

Em nosso estudo, nos três ensaios de atividade antioxidante avaliados, as frações peptídicas obtidas por ultrafiltração exibiram maior capacidade de captura de radicais e redução do ferro que os hidrolisados, indicando que as membranas seletivas de diferentes massas moleculares são úteis em concentrar peptídeos antioxidantes. Existem vários relatos onde a correlação entre diferentes compostos e a atividade antioxidante *in vitro* tem sido avaliada (SEGURA-CAMPOS et al., 2013; VAVRUSOVA et al., 2015). No entanto, esses estudos apresentam resultados contraditórios, pois a capacidade antioxidante depende de muitos fatores. Entre outros, devemos considerar a interação entre diferentes fenóis com proteínas ou os componentes da matriz de alimentos.

A oxidação dos constituintes de alimentos é uma resposta a deterioração dos alimentos. Sabe-se que a peroxidação lipídica de produtos alimentares pode causar deterioração na qualidade dos alimentos, diminuir a vida útil e a aceitabilidade dos alimentos processados. A peroxidação lipídica pode gerar radicais livres que podem levar à decomposição de ácidos graxos, o que pode reduzir o valor nutricional e a segurança dos alimentos, produzindo flavor indesejável e substâncias tóxicas (NIKI et al., 2005). Além disso, as reações mediadas por radicais livres têm um papel significativo em muitos fenômenos biológicos, como danos

celulares e envelhecimento, estimulando a oxidação de lipídios e a formação de produtos secundários de peroxidação lipídica.

5.6. EFEITOS DOS PEPTÍDEOS SELECIONADOS NA OXIDAÇÃO LIPÍDICA DA CARNE

Os hidrolisados de proteínas demonstraram inibir efetivamente a oxidação dos lipídios em produtos alimentares (KONG; XIONG, 2006), sugerindo que hidrolisados/peptídeos específicos podem ser utilizados como antioxidantes naturais quando adicionados a produtos alimentares para melhorar a qualidade e a estabilidade.

Os produtos ricos em lipídios, como carne moída, são um modelo alimentar comumente utilizado para avaliar o potencial dos agentes no controle da oxidação lipídica. Em nosso estudo, a carne moída foi preparada para determinar se os peptídeos com propriedades antioxidantes notáveis (conforme verificado pelos métodos DPPH e FRAP) podem efetivamente inibir a oxidação lipídica em amostras de carne durante o armazenamento. Conforme refletido pelos resultados de TBARS (Tabela 9), houve uma clara indicação de oxidação lipídica nas amostras de carne bovina que aumentou progressivamente em função do tempo de armazenamento.

No período inicial de armazenamento, todas as amostras de carne apresentaram certo grau de oxidação lipídica com valores já conhecidos de TBARS (0,15 – 0,48 mg equivalentes de MDA kg^{-1} de carne bovina). As carnes tratadas com as frações CPC1-F F2, CF-S F3, PRF-A F3 e CF-A F3 em 250 $\mu\text{g g}^{-1}$ e as frações CF-S F3 e PRF-A F3 em 500 $\mu\text{g g}^{-1}$ apresentaram um valor de TBARS significativamente inferior ($p < 0,05$), cerca de 73% menor em relação ao controle. No dia 2 de armazenamento, todos os tratamentos antioxidantes apresentaram efeitos inibitórios significativos ($p < 0,05$) na oxidação lipídica da carne, com exceção das frações CPC1-F, F2 500 $\mu\text{g g}^{-1}$, CPC1-A F2 em ambas as concentrações estudadas.

Os valores de TBARS das amostras de carne tratadas com CPC1-S F2 e CPC2-F F2 a 500 $\mu\text{g g}^{-1}$ no dia 2 foram 58,7% e 61,2%, respectivamente, menores que as do controle. Zhou, Sun e Canning (2012) verificaram que em 15 dias de armazenamento, a fração peptídica entre 1 e 3 kDa de hidrolisado proteico de milho utilizando a enzima Neutral foi a única fração que inibiu oxidação lipídica em níveis de 250 e 500 $\mu\text{g g}^{-1}$ em até 52,9%. Kumar et al. (2016a) observaram um aumento acentuado no valor de TBARS na emulsão controle ($0,402 \pm 0,03$ no dia 0 a $1,181 \pm 0,114$ mg de malonaldeído kg^{-1} no dia 6) em comparação com emulsões tratadas com 0,03% de hidrolisado durante o armazenamento refrigerado (0,718-0,812 mg de malonaldeído kg^{-1} de carne no dia 6), semelhante aos resultados encontrados neste estudo.

Tabela 9 - Inibição da oxidação lipídica da carne pelas frações peptídicas do subproduto farinha (CF), fração rica em proteína (PRF), concentrado proteico 1 (CPC1) e concentrado proteico 2 (CPC2) de chia durante 6 dias de armazenamento a 4 °C

Frações selecionadas	Concentração na carne ($\mu\text{g g}^{-1}$)	TBA (mg MDA kg^{-1} de carne)			
		Dia 0	Dia 2	Dia 4	Dia 6
Controle	0	$0,48 \pm 0,008^{a,D}$	$0,80 \pm 0,019^{a,C}$	$0,95 \pm 0,008^{c,B}$	$1,17 \pm 0,005^{d,A}$
CPC1-F F2	250	$0,16 \pm 0,004^{i,j,D}$	$0,60 \pm 0,010^{b,C}$	$1,23 \pm 0,027^{b,B}$	$1,58 \pm 0,025^{a,b,A}$
CPC1-F F2	500	$0,23 \pm 0,003^{e,f,D}$	$0,81 \pm 0,005^{a,C}$	$0,98 \pm 0,010^{c,B}$	$1,55 \pm 0,075^{a,b,A}$
CPC1-A F2	250	$0,18 \pm 0,005^{g,h,i,D}$	$0,77 \pm 0,014^{a,C}$	$1,36 \pm 0,024^{a,B}$	$1,65 \pm 0,006^{a,A}$
CPC1-A F2	500	$0,19 \pm 0,003^{g,h,D}$	$0,75 \pm 0,009^{a,C}$	$1,18 \pm 0,003^{b,B}$	$1,48 \pm 0,031^{b,c,A}$
CPC1-S F2	250	$0,41 \pm 0,031^{b,C}$	$0,55 \pm 0,008^{b,c,d,B}$	$0,62 \pm 0,009^{e,f,B}$	$1,36 \pm 0,058^{c,A}$
CPC1-S F2	500	$0,28 \pm 0,005^{c,C}$	$0,33 \pm 0,003^{g,h,C}$	$0,81 \pm 0,016^{d,B}$	$0,96 \pm 0,044^{f,A}$
CPC2-S F2	250	$0,27 \pm 0,019^{c,d,D}$	$0,57 \pm 0,001^{b,c,C}$	$0,80 \pm 0,061^{d,B}$	$1,01 \pm 0,063^{e,f,A}$
CPC2-S F2	500	$0,24 \pm 0,004^{d,e,C}$	$0,48 \pm 0,014^{d,e,f,B}$	$0,47 \pm 0,013^{i,B}$	$0,53 \pm 0,011^{j,A}$
CPC2-F F2	250	$0,20 \pm 0,004^{f,g,D}$	$0,51 \pm 0,004^{c,d,e,C}$	$0,65 \pm 0,033^{e,B}$	$1,00 \pm 0,008^{e,f,A}$
CPC2-F F2	500	$0,39 \pm 0,017^{b,C}$	$0,31 \pm 0,008^{h,D}$	$0,65 \pm 0,016^{e,B}$	$1,13 \pm 0,006^{d,e,A}$
CF-S F3	250	$0,15 \pm 0,005^{h,i,j,D}$	$0,43 \pm 0,038^{e,f,C}$	$0,53 \pm 0,006^{h,i,B}$	$0,72 \pm 0,003^{g,h,i,A}$
CF-S F3	500	$0,13 \pm 0,012^{j,C}$	$0,47 \pm 0,037^{d,e,f,B}$	$0,59 \pm 0,009^{e,f,g,h,A,B}$	$0,68 \pm 0,118^{h,i,A}$
PRF-A F3	250	$0,14 \pm 0,005^{i,D}$	$0,42 \pm 0,034^{f,g,C}$	$0,61 \pm 0,006^{e,f,g,B}$	$0,67 \pm 0,009^{h,i,A}$
PRF-A F3	500	$0,15 \pm 0,003^{i,j,C}$	$0,49 \pm 0,051^{d,e,f,B}$	$0,62 \pm 0,007^{e,f,A}$	$0,62 \pm 0,010^{i,j,A}$
CF-A F3	250	$0,15 \pm 0,005^{i,j,D}$	$0,49 \pm 0,034^{d,e,f,C}$	$0,56 \pm 0,013^{f,g,h,B}$	$0,78 \pm 0,011^{g,h,A}$
CF-A F3	500	$0,19 \pm 0,006^{g,C}$	$0,60 \pm 0,062^{b,B}$	$0,55 \pm 0,008^{g,h,B}$	$0,82 \pm 0,014^{g,A}$

Média $\pm$ desvio padrão; desvio padrão seguidos de letras minúsculas: diferença significativa entre as amostras (colunas) ($p < 0,05$); Letras maiúsculas: diferença significativa entre os dias de armazenamento para a mesma amostra (linhas) ($p < 0,05$). A: Alcalase, F: Flavourzyme, S: Sequencial Alcalase-Flavourzyme; Fração 2, F2, representa as frações peptídicas de tamanho molecular 3-10 kDa; e fração 3, F3, representa as frações peptídicas de tamanho molecular < 3 kDa. MDA: malonaldeído; TBA: ácido 2-tiobarbitúrico.

No dia 4 de armazenamento, os tratamentos CPC2-S F2 a 500 $\mu\text{g g}^{-1}$ e CF-S F3 a 250 $\mu\text{g g}^{-1}$ continuaram a inibir a oxidação lipídica na carne cozida em que os valores de TBARS foram significativamente reduzidos em 50,5 e 42,4% em relação ao controle. Semelhante aos resultados obtidos, no dia 6 do armazenamento, o tratamento com CPC2-S F2 e PRF-A F3 (ambas em 500 $\mu\text{g g}^{-1}$) inibiram a oxidação lipídica da carne em 54,7 e 47%, respectivamente, sugerindo que o efeito inibitório do CPC2-S F2 e PRF-A F3 é sustentável mesmo após o armazenamento. Kumar et al. (2016b) utilizaram uma emulsão de carne de cabra como modelo alimentar para determinar se o hidrolisado da caseína de leite de camelo por Alcalase selecionado com fortes propriedades antioxidantes pode efetivamente inibir a peroxidação lipídica da carne durante o armazenamento de 6 dias: o valor de TBARS da emulsão tratada, bem como do controle (sem hidrolisado) aumentaram durante o armazenamento, no entanto, a emulsão tratada com hidrolisado mantiveram valores mais baixos, comparados com o controle, exceto no dia 0.

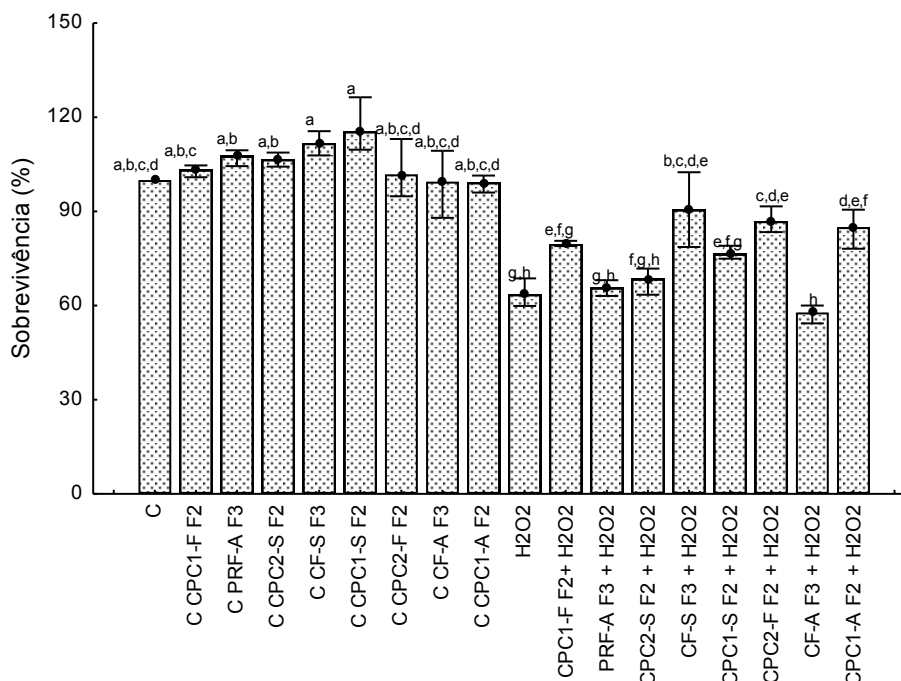
É provável que a enzima e a matéria-prima utilizada na hidrólise afeta o resultado na inibição da oxidação lipídica da carne principalmente associada à sua composição aminoacídica. Entretanto, os tratamentos CPC1-S F2 (500 $\mu\text{g g}^{-1}$), CPC2-F F2 (250 $\mu\text{g g}^{-1}$), CPC2-S F2, PRF-A F3, CF-A F3 e CF-S F3 (ambas concentrações) também reduziram significativamente ($p < 0,05$) ao 6º dia de armazenamento a oxidação lipídica da carne. Em geral, esses resultados fornecem evidências de que os hidrolisados de proteína de chia preparados a partir de proteases microbianas podem efetivamente inibir a oxidação lipídica em sistemas alimentares. A manutenção de valores mais baixos de TBARS em carne tratadas pode ser devido à presença de atividade antioxidante de hidrolisados de proteínas de chia.

5.7. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VIVO* DOS PEPTÍDEOS SELECIONADOS

Os ensaios de atividade antioxidante *in vitro* não refletem necessariamente as condições fisiológicas celulares nem consideram a biodisponibilidade e os problemas metabólicos (LIU; FINLEY, 2005). Portanto, é importante verificar se os compostos que são excelentes antioxidantes *in vitro* também funcionam *in vivo*. Assim, também avaliamos o efeito antioxidante dos hidrolisados de chia selecionados utilizando a levedura *S. cerevisiae* como um modelo simples para avaliar se os peptídeos com atividade antioxidante observada *in vitro* pode ser correlacionada em sistemas vivos. Para analisar a capacidade dos peptídeos de chia de

proteger as células de *S. cerevisiae* contra danos, induzido pelo H_2O_2 (agente estressor) a viabilidade celular foi determinada na presença de peptídeos como quimioprotetor (antioxidante externo). A Figura 24 apresenta os resultados para as taxas de sobrevivência de *S. cerevisiae* para os diferentes tratamentos estudados.

Figura 24 - Taxas de sobrevivência de *S. cerevisiae* tratadas com frações peptídicas de chia em presença e ausência de agente estressor (H_2O_2)



Média $\pm$ desvio padrão; letras minúsculas: diferença significativa entre as amostras ($p < 0,05$); C: Controle, C CPC1: controle contendo fração peptídica do concentrado proteico 1 e célula de levedura, C PRF: controle contendo fração peptídica da fração rica em proteína e célula de levedura, C CPC2: controle contendo fração peptídica do concentrado proteico 2 e célula de levedura, C CF: controle contendo fração peptídica do subproduto e célula de levedura, A: Alcalase, F: Flavourzyme, S: Sequencial Alcalase-Flavourzyme; F2, fração 2: representa as frações peptídicas de tamanho molecular 3-10 kDa; e F3, fração 3: representa as frações peptídicas de tamanho molecular < 3 kDa, H_2O_2 : células de levedura na presença do agente estressor, + H_2O_2 : amostras contendo peróxido de hidrogênio – agente estressor.

O aumento da viabilidade celular ao tratamento sugere atividade protetora (antioxidante) e a diminuição da viabilidade a um efeito deletério (pró-oxidante) (ROEHRs et al., 2010). Como esperado, as células de levedura mostraram sensibilidade para H_2O_2 (0,75 mM L^{-1}) e apenas 63,5% foram capazes de sobreviver ao estresse oxidativo (Figura 24). A contagem das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) do tratamento controle representa 100% de sobrevivência, pois não teve influência dos agentes estressor e antioxidante. Um controle de cada fração peptídica estudada também foi realizado para verificar se as frações peptídicas não teriam comportamento de agente estressor. Especificamente, CF-S F3 aumentou em 27% a taxa de sobrevivência em relação às células de levedura expostas a H_2O_2 . As frações peptídicas

CPC2-F F2, CPC1-A F2 e CPC1-F F2 também aumentaram a taxa de sobrevivência em 23,4, 21,5 e 16%, respectivamente. Entre as 8 frações peptídicas estudadas, 4 (PRF-A F3, CPC2-S F2, CPC1-S F2 e CF-A F3) não apresentaram capacidade de reduzir o estresse oxidativo causado por H₂O₂ em *S. cerevisiae*.

Apesar de não haver estudos referentes ao ensaio de estresse oxidativo utilizando *S. cerevisiae* em hidrolisados proteicos, há estudos de compostos fenólicos (BARONI et al., 2012; DI PAOLA NARANJO et al., 2016; MARTORELL et al., 2011; STINCO et al., 2015) e o mecanismo subjacente ao efeito protetor dos polifenóis para as células ainda não é bem compreendido. Entretanto, Baroni et al. (2012) relataram que a atividade antioxidante detectada utilizando a levedura pode ser resultante de diferentes atividades produzidas por polifenóis individuais presentes nos vinhos tintos, incluindo efeitos aditivos, sinérgicos e antagônicos. A atividade biológica observada poderia ser atribuída à mistura de compostos fenólicos presentes em vez de um único composto. Ou seja, os polifenóis podem estar agindo como sequestradores de radicais, ativando outras enzimas antioxidantes ou induzindo enzimas relacionadas a glutathione reduzida (GSH). Podemos então fazer uma associação com este estudo: o tipo de aminoácido e a sequência peptídica presentes nas frações peptídicas testadas podem apresentar efeitos adversos na avaliação da atividade antioxidante *in vivo*.

Uma característica importante dos peptídeos é a sua capacidade de quelar metais. A presença de grupos carboxila e amino nas cadeias laterais de aminoácidos ácidos (Glutâmico e Aspártico) e básicos (Lisina, Histidina e Arginina), faz com que algumas proteínas e peptídeos consigam quelar íons metálicos (GIMÉNEZ et al., 2009; SAIGA; TANABE; NISHIMURA, 2003). Os peptídeos podem assim, complexar-se com metais, tais com Fe³⁺ e Cu²⁺ evitando/diminuindo a geração de radicais hidroxila pela reação de Haber-Weiss/Fenton.

Resultados semelhantes ao encontrado neste estudo foram obtidos por Baroni et al. (2012) que estudando esta atividade em vinho, o Cabernet Sauvignon aumentou em 26% a taxa de sobrevivência em relação às células de levedura expostas a H₂O₂ (sem vinho); Malbec e Syrah também aumentaram a taxa de sobrevivência em 16% e 13%, respectivamente. Estes resultados reforçam a ideia dos benefícios da utilização de antioxidantes em alimentos, cosméticos e medicamentos, por isso a busca crescente de estudos acerca da capacidade antioxidante de compostos naturais devem ser realizados, a fim de que possam vir a substituir os antioxidantes sintéticos como o BHT, sem prejuízo da capacidade antioxidante e sem os efeitos indesejáveis relatados para os mesmos. O mecanismo de ação antioxidante ocorre de várias maneiras. Acima de tudo, eles podem doar elétrons, neutralizando assim as espécies

reativas de oxigênio e protegendo as células contra danos (MUSZYŃSKA et al., 2018). Com isso, sugere-se que as frações peptídicas de chia podem futuramente, agir como antioxidantes e prevenir doenças que são causadas por danos celulares, além de melhorarem a saúde do sistema imunológico. Maiores estudos devem ser realizados para verificar a atividade desses peptídeos quando submetidos a digestão gastrointestinal.

5.8. ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS HIDROLISADOS PROTEICOS DE CHIA

A atividade antibacteriana foi investigada para os hidrolisados. A Tabela 10 apresenta os resultados para a atividade antibacteriana pelo teste de disco difusão para verificação preliminar da atividade antibacteriana antes de estudos mais detalhados.

Tabela 10 - Atividade antibacteriana de hidrolisados de proteína de chia obtidos por três sistemas enzimáticos

Hidrolisados	Bactérias	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i> O157:H7
CF-A	++	+
CF-F	-	-
CF-S	+++	-
PRF-A	+++	+
PRF-F	+++	+
PRF-S	++	-
CPC1-A	++	-
CPC1-F	-	-
CPC1-S	+++	-
CPC2-A	++	-
CPC2-F	-	-
CPC2-S	++	+

Zonas de inibição: +++ (diâmetro > 14,0 mm); ++ (diâmetro entre 10,0 e 13,0 mm); + (diâmetro < 10,0 mm); - (sem atividade). CF (farinha de chia parcialmente desengordurada, subproduto), PRF (fração rica em proteína) e CPC1 e CPC2 (concentrados de proteína de chia). -A: Alcalase, -F: Flavourzyme, -S: Alcalase-Flavourzyme sequencial

Uma zona de inibição clara do crescimento foi observada, e os hidrolisados apresentaram atividade frente bactérias Gram positivas (G⁺) e Gram negativas (G⁻). Os

hidrolisados obtidos com a enzima Alcalase, nos diferentes métodos de isolamento de proteínas, o subproduto CF, a fração PRF e os concentrados CPC1 e CPC2 mostraram inibição para *S. aureus* e o subproduto CF e a fração PRF para *E. coli*. Para a enzima Flavourzyme, entre os diferentes métodos de extração de proteínas, a fração PRF mostrou inibição para *S. aureus* e *E. coli*. Para o sistema sequencial Alcalase-Flavourzyme, todos os métodos de extração de proteínas (CF, PRF, CPC1 e CPC2) mostraram inibição para *S. aureus*, e somente o concentrado CPC2 inibiu *E. coli*. No entanto, o efeito antibacteriano dos hidrolisados foi considerado inativo (zonas de inibição < 10 mm) contra *E. coli*, o que foi confirmado pela concentração mínima inibitória (CMI). Isto se deve ao fato de que, provavelmente o halo foi gerado por um impedimento físico do crescimento de *E. coli* no ágar decorrente da presença da substância testada. A Tabela 11 apresenta os valores de concentração mínima inibitória e bactericida de hidrolisados antibacterianos de proteína de chia.

Tabela 11 - Valores de concentração mínima inibitória (CMI) e bactericida (CMB) de hidrolisados antibacterianos de proteína de chia

Hidrolisado	Bactérias	CMI (mg mL ⁻¹)	CMB (mg mL ⁻¹)
CF-A	<i>Staphylococcus aureus</i>	3,70 ± 0,137 ^b	ND
CF-S	<i>Staphylococcus aureus</i>	4,40 ± 0,198 ^a	ND
PRF-A	<i>Staphylococcus aureus</i>	4,35 ± 0,161 ^a	5
PRF-F	<i>Staphylococcus aureus</i>	0,58 ± 0,157 ^e	5
PRF-S	<i>Staphylococcus aureus</i>	0,73 ± 0,182 ^e	ND
CPC1-A	<i>Staphylococcus aureus</i>	3,19 ± 0,050 ^c	ND
CPC1-S	<i>Staphylococcus aureus</i>	3,15 ± 0,067 ^c	ND
CPC2-A	<i>Staphylococcus aureus</i>	2,85 ± 0,244 ^c	5
CPC2-S	<i>Staphylococcus aureus</i>	2,26 ± 0,258 ^d	5
CF-A	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	ND	ND
PRF-A	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	ND	ND
PRF-F	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	ND	ND
CPC2-S	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	ND	ND

Média ± desvio padrão (n = 3); o desvio padrão seguido por diferentes letras minúsculas na mesma coluna indica que as amostras são significativamente diferentes (p < 0,05). ND indica não detectado, isto é, não teve atividade. CF (farinha de chia parcialmente desengordurada, subproduto), PRF (fração rica em proteína) e CPC1 e CPC2 (concentrados de proteína de chia). Enzimas: -A (Alcalase), -F (Flavourzyme), -S (Seqüencial Alcalase-Flavourzyme).

Os resultados do ensaio de difusão em ágar praticamente mostraram que os hidrolisados não tinham um efeito antibacteriano contra a bactéria G^- testada. No entanto, observou-se uma zona de inibição quando os hidrolisados foram testados contra *S. aureus*. Mesmo assim, o CMI e o CMB foram determinados para os diferentes métodos de extração de proteínas. Os resultados da CMI confirmaram os resultados previamente encontrados com o método de difusão em ágar. Mais fragmentos de resíduos hidrofóbicos em hidrolisado enzimático melhoram a combinação favorável com proteínas lipofílicas na membrana celular, que posteriormente apresenta efeitos inibitórios através de mecanismos antibacterianos específicos (HANEY et al., 2013). Este resultado demonstra a importância de inibição para o *S. aureus* pois, esta espécie bacteriana produz toxinas termoestáveis que podem permanecer no alimento mesmo após o cozimento.

Embora a Alcalase tenha sido amplamente utilizada em muitas aplicações biotecnológicas, sua especificidade não foi totalmente caracterizada. Sabe-se que esta enzima hidrolisa principalmente ligações peptídicas contendo resíduos hidrofóbicos no lado carboxilo (ADLER-NISSEN, 1986). Estes elementos podem favorecer a sua ligação a numerosos componentes aniônicos na membrana celular bacteriana, que favorece os seus efeitos antibacterianos por formação de estruturas análogas. Por isso, os hidrolisados obtidos mediante o sistema Alcalase provavelmente mostraram atividade antibacteriana na maioria das amostras. Sun et al. (2016) observaram efeitos antibacterianos significativos contra *E. coli* e *S. aureus*, com valores de CMI de 8 e 16 mg mL⁻¹, respectivamente, para hidrolisados de proteínas de *Spirulina platensis*, valores superiores aos encontrados neste estudo. Osman et al. (2016) mostraram que os hidrolisados de proteínas de soro de leite de cabra obtidos com Alcalase exibiram atividade antibacteriana contra duas bactérias G^+ (*S. aureus* ATCC 25923 e *Bacillus cereus* ATCC 33018) e duas bactérias G^- (*S. typhimurium* ATCC 14028 e *E. coli* ATCC 8739) com zonas inibitórias maiores contra *S. typhimurium* e *S. aureus*.

A maior sensibilidade das bactérias G^+ aos hidrolisados está relacionada às características estruturais das próprias bactérias; a parede da célula G^+ tem apenas uma camada, composta principalmente por peptidoglicano, diferente das bactérias G^- que possuem uma membrana externa composta por uma camada dupla de lipopolissacarídeos (NAZZARO et al., 2013). Os valores de CMI obtidos a partir das concentrações testadas variaram de 0,58 para 4,4 mg mL⁻¹. Além disso, a intensidade desta atividade antibacteriana variou com a enzima e com os diferentes métodos de extração de proteínas utilizados para hidrólise. Os resultados indicam que os efeitos antibacterianos de Flavourzyme e sequencial Alcalase-Flavourzyme são

melhores que os de Alcalase. Este resultado é provavelmente devido à liberação de alguns peptídeos antibacterianos após a hidrólise da Flavourzyme nas proteínas de chia.

No entanto, Sila et al. (2014) relataram que os hidrolisados proteicos de pescado com baixo GH (2,8%) ou com alto GH (15,54% e 16,2%) não conseguiram inibir o crescimento bacteriano, mas com um GH médio de 6,6% demonstraram um efeito antibacteriano contra um amplo espectro de bactérias. Cheng et al. (2013) atribuíram esse resultado à hidrofobicidade do peptídeo. A hidrofobicidade de peptídeos antibacterianos tem sido descrita como um fator importante nas interações peptídicas com membranas citoplasmáticas bacterianas. Os hidrolisados de truta demonstraram um amplo espectro de atividade e inibiram o crescimento de bactérias G^+ e G^- (WALD et al., 2016). Para isso, dependendo da bactéria, uma quantidade peptídica de 2-47 mg mL⁻¹ resultou em inibição completa do crescimento com um tempo de incubação de 24 h e uma concentração bacteriana de $1-2 \times 10^6$ UFC mL⁻¹. Neste estudo, as menores concentrações de peptídeos foram muitas vezes necessárias para hidrolisados com um GH menor [5,44%] (PRF-F) e hidrolisados com um GH maior [25,03%] (PRF-S).

As frações com os maiores halos de inibição também apresentaram menores valores de CMI, resultando em alta atividade antibacteriana e efeito bactericida (CMB), o que provavelmente pode ser atribuído à parede celular das bactérias G^+ que determina a permeabilidade e susceptibilidade das células aos agentes antibacterianos (YOKOTA; FUJII, 2007). O efeito bactericida das proteínas de chia e os valores de CMB são mostrados na Tabela 11. A análise dos valores mostra que *S. aureus* foi destruído por hidrolisados de proteína de chia na concentração de 5 mg mL⁻¹. Doses maiores de hidrolisados foram necessárias para matar *S. aureus*. Hu et al. (2016) observaram que, para peptídeos isolados de hemoglobina de frango, a maioria das bactérias foram mortas em concentrações que variaram de 5 a 80 µg mL⁻¹. Os hidrolisados da fração PRF e do concentrado CPC2 apresentaram atividade antibacteriana efetiva pelos parâmetros CMI e CMB, ou seja, são produtos capazes de ação bactericidas e bacteriostáticos.

5.9. ATIVIDADE HIPOCOLESTEROLÊMICA *IN VITRO* DAS FRAÇÕES PEPTÍDICAS DE CHIA

A 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (HMG-CoA redutase) é uma enzima chave na produção de colesterol hepático humano. Por esse motivo, o conhecimento da taxa de colesterol possibilitou o desenvolvimento de medicamentos para o tratamento com

hipercolesterolemia. Para avaliação desta bioatividade, as frações F3 (< 3 kDa) foram utilizadas pois são estruturas semelhante às estatinas. A Tabela 12 apresenta os resultados da percentagem de inibição da enzima HMG-CoA redutase na presença de várias concentrações de frações peptídicas.

A pravastatina utilizada como inibidor padrão da reação o inibiu em 81,5%. As estatinas, como a pravastatina, são inibidores seletivos e competitivos da HMG-CoA redutase, responsável pela conversão da HMG-CoA a mevalonato, um precursor do colesterol. Uma vez que certos peptídeos são estruturalmente não relacionados com as estatinas existentes, os peptídeos bioativos encontrados neste trabalho podem representar uma nova classe de inibidor de HMG-CoA redutase. Estes peptídeos podem interagir diretamente com esta enzima para bloquear a via do mevalonato e prevenir a hipercolesterolemia (SOARES et al., 2015).

Tabela 12 - Inibição percentual da enzima HMG-CoA redutase na presença de proteína de chia hidrolisada filtrada através de uma membrana de corte de 3 KDa

Peptídeos F3 (< 3 kDa)	% Inibição		
	1 mg mL ⁻¹	2 mg mL ⁻¹	3 mg mL ⁻¹
CF-A	36,7 ± 7,52 ^{b,B}	64,7 ± 7,64 ^{a,b,A}	60,4 ± 11,84 ^{a,b,A}
CF-F	66,3 ± 5,69 ^{a,A}	64,3 ± 8,24 ^{a,b,A}	55,9 ± 19,18 ^{a,b,A}
CF-S	64,8 ± 3,59 ^{a,B}	64,1 ± 5,24 ^{a,b,B}	80,7 ± 3,29 ^{a,A}
PRF-A	66,9 ± 1,79 ^{a,A}	34,1 ± 13,49 ^{b,c,B}	68,8 ± 4,79 ^{a,b,A}
PRF-F	79,9 ± 8,26 ^{a,A}	63,1 ± 10,15 ^{a,b,B}	56,5 ± 11,49 ^{a,b,B}
PRF-S	12,7 ± 1,64 ^{c,B}	64,5 ± 0,14 ^{a,b,A}	65,6 ± 0,89 ^{a,b,A}
CPC1-A	62,3 ± 8,09 ^{a,A}	70,8 ± 0,74 ^{a,A}	67,1 ± 9,89 ^{a,b,A}
CPC1-F	67,3 ± 9,29 ^{a,A}	66,8 ± 1,34 ^{a,A,B}	54,3 ± 8,24 ^{b,B}
CPC1-S	13,9 ± 2,69 ^{c,B}	61,8 ± 14,39 ^{a,b,c,A}	53,7 ± 20,83 ^{b,A}
CPC2-A	31,5 ± 3,29 ^{b,c,B}	70,0 ± 4,64 ^{a,A}	70,1 ± 1,79 ^{a,b,A}
CPC2-F	20,8 ± 1,04 ^{b,c,B}	30,7 ± 1,79 ^{c,B}	49,7 ± 13,79 ^{b,A}
CPC2-S	25,8 ± 3,29 ^{b,c,B}	59,9 ± 10,79 ^{a,b,c,A}	57,6 ± 10,79 ^{a,b,A}

Média ± desvio padrão; o desvio padrão seguido de letras minúsculas diferentes na mesma coluna e letras maiúsculas diferentes na mesma linha são significativamente diferentes ($p < 0,05$). CF (farinha de chia parcialmente desengordurada, subproduto), PRF (fração de proteína rica) e CPC1, CPC2 (concentrados de proteína de chia). Sistema enzimático: -A (Alcalase), -F (Flavourzyme), -S (Sequencial Alcalase-Flavourzyme).

Os peptídeos de chia apresentaram diferentes comportamentos frente a inibição da enzima HMG-CoA redutase. O subproduto CF-S mostrou a maior atividade na maior

concentração (3 mg mL^{-1}), enquanto a fração PRF-F apresentou a maior atividade na menor concentração investigada (1 mg mL^{-1}). Esses peptídeos foram mais efetivos em inibir a enzima HMG-CoA redutase, enquanto o concentrado CPC2-F foi o menos efetivo. Os estudos de Pak et al. (2010) demonstraram que os peptídeos derivados da fração 11S da soja foram capazes de promover a inibição competitiva da enzima HMG-CoA redutase. Eles observaram porcentagens de inibição de 37% a 75%, dependendo da fração testada. Os peptídeos do amaranto apresentaram cerca de 40% de inibição, mas foram menos efetivos que a pravastatina ($\sim 90\%$) (SOARES et al., 2015).

Destacamos duas amostras que apresentaram atividade semelhante à pravastatina: CF-S (80,7% de inibição na concentração de 3 mg mL^{-1}) e PRF-F (79,9% de inibição na concentração de 1 mg mL^{-1}). O que surpreende é que para a produção de peptídeos hipocolesterolêmicos não há a necessidade de concentrar as proteínas de chia, pois o subproduto CF e a fração PRF apresentaram os melhores resultados. O efeito dos peptídeos na inibição da HMG-CoA redutase pode ser explicado pela estrutura conformacional dos peptídeos. A hidrólise utilizando Flavourzyme resulta na liberação de aminoácidos N-terminais em ordem sequencial, em que o primeiro aminoácido do hidrolisado é de preferência leucina, mas podem ser outros, incluindo a prolina (HAMMERSHØJ; NEBEL; CARSTENS, 2008). A presença constante de um resíduo de prolina permite uma estrutura tridimensional devido ao ângulo de torção proporcionado por este aminoácido. Esta estrutura é semelhante à das estatinas, medicamentos utilizados para o tratamento médico da hipercolesterolemia (PAK et al., 2005).

Outros autores também obtiveram resultados semelhantes a este estudo para proteínas vegetais. Os peptídeos presentes em três frações estudadas de proteína de feijão caupi podem inibir a atividade da HMG-CoA redutase com valores que variaram de 47,8 a 57,1% de inibição. A pravastatina, usado como controle positivo, exibiu 80% de inibição (MARQUES et al., 2015a). Em estudo anterior, Marques et al. (2015b) demonstraram que o hidrolisado de feijão caupi era capaz de inibir quase 25% da velocidade da reação. Esta inibição pode ser explicada pela interação desses peptídeos com o domínio catalítico da enzima. Além disso, a reação também depende da ligação do cofator NADPH. A HMG-CoA redutase tem um segundo domínio que é capaz de aceitar NADPH, e estes peptídeos também podem impedir a sua ligação, diminuindo a velocidade da reação (ISTVAN; DEISENHOFER, 2001). Em geral, os sítios de ligação a enzimas são formados por aminoácidos hidrofóbicos localizados mais profundamente dentro da molécula. Esses mecanismos somente podem ser esclarecidos por

estudos cinéticos da inibição observada, bem como o isolamento das sequências de peptídeos exatas responsáveis por cada um desses resultados.

Destaca-se o fato de que esses resultados confirmam que a digestão enzimática das proteínas de chia, independentemente do método utilizado para obtê-las, libera peptídeos capazes de inibir HMG-CoA redutase. O método de produção das proteínas de chia e a enzima utilizada afetam significativamente a capacidade de um peptídeo inibir a HMG-CoA redutase. Utilizando o sistema enzimático Flavourzyme, na menor concentração de peptídeos apresentou maior atividade, ao contrário da Alcalase, para a qual na maior concentração utilizada, maior foi a atividade (Tabela 12). O consumo regular de proteínas de chia resulta em redução efetiva do colesterol, o que pode ser causado principalmente pela digestão, liberação e absorção incompleta desses peptídeos. Mais estudos são necessários para verificar o tipo de inibição da HMG-CoA redutase promovida pelos peptídeos encontrados neste estudo e se existe um efeito real do seu consumo na dieta.

6 CONCLUSÃO

6.1. CONCLUSÕES PARCIAIS

✓ Inicialmente, mostramos como a escolha do método de isolamento afeta as propriedades físico-químicas e funcionais dos produtos proteicos gerados a partir do subproduto da produção do óleo de chia;

✓ Verificamos que as propriedades de gelificação, conteúdo, estrutura e condições de processamento das proteínas de chia influenciam sua solubilidade, bem como sua capacidade de emulsão e de espuma. Além disso, os métodos de extração química alteram a morfologia da superfície e a composição de aminoácidos das proteínas obtidas. Os concentrados proteicos 1 e 2 apresentaram baixa atividade e estabilidade emulsificante em comparação com o subproduto farinha de chia parcialmente desengordurada e fração rica em proteínas. Embora a fração rica em proteínas tenha apresentado o menor teor de proteína (50%) dos produtos proteicos, possui as melhores propriedades funcionais, incluindo maior solubilidade proteica, maior absorção de água e formação de espuma, maior capacidade de emulsificação e gelificação;

✓ Comparando os diferentes métodos de extração de proteínas no mesmo tempo de hidrólise, os maiores valores de grau de hidrólise foram obtidos nos concentrados proteicos 1 e 2, especialmente utilizando os sistemas enzimáticos Alcalase e sequencial Alcalase-Flavourzyme. Houve uma relação entre o valor de grau de hidrólise e os rendimentos das frações peptídicas: quanto maior o grau de hidrólise, maior o rendimento dos peptídeos de menor tamanho molecular;

✓ Todas as amostras testadas apresentaram atividade antioxidante *in vitro*, verificando que hidrolisados de proteína de chia preparados a partir de proteases microbianas podem inibir efetivamente a oxidação de lipídios em modelos alimentares. Demonstrou-se neste estudo, a única fração que inibiu a oxidação lipídica em carne moída nos dois níveis estudados: a fração peptídica de menor tamanho molecular da fração rica em proteínas hidrolisada pela Alcalase. Foi possível verificar que a levedura *S. cerevisiae* pode ser proposta como modelo celular para uma triagem rápida de atividade antioxidante *in vivo*. Quatro frações peptídicas de chia (CF-S, F3; CPC2-F F2; CPC1-A F2 e CPC1-F F2) conseguiram aumentar a taxa de sobrevivência da levedura frente a um agente estressor;

✓ Os resultados mostraram que diferentes métodos para a obtenção de proteína de chia submetida ao processo de hidrólise enzimática resultaram em peptídeos bioativos com

diferentes propriedades antibacterianas. Em geral, os hidrolisados proteicos apresentaram ação inibidora do crescimento de *S. aureus* em comparação com o crescimento de *E. coli*. Além disso, duas amostras de hidrolisados proteicos apresentaram também atividade bactericida frente a *S. aureus* na concentração de 5 mg mL⁻¹;

✓ Este é o primeiro relato de peptídeos de chia que demonstra sua capacidade de promover a inibição da enzima HMG-CoA redutase. A concentração das frações peptídicas estudadas afeta a atividade hipocolesterolêmica, destacando duas frações peptídicas menores que 3 kDa que apresentaram atividade semelhante à pravastatina: subproduto farinha de chia parcialmente desengordurada hidrolisada por sistema sequencial e fração rica em proteínas hidrolisada pela Flavourzyme.

6.2. CONCLUSÃO GERAL

✓ Neste estudo, demonstrou-se que é possível a utilização do subproduto da obtenção de óleo de chia como fonte de proteínas com boas propriedades funcionais e que, os produtos da hidrólise enzimática podem ser aplicados como ingredientes alimentares contendo peptídeos bioativos criptografados nas sequências primárias de aminoácidos, podendo ser usados como ingredientes com atividade antioxidante, antibacteriana e hipocolesterolêmica. Os peptídeos bioativos de chia tem potencial para serem aplicados tanto em alimentos funcionais quanto em aplicações nutracêuticas, com novas implicações para a segurança alimentar e saúde humana.

7 SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar o efeito dos hidrolisados obtidos no sistema gastrointestinal e avaliar as atividades antioxidante, antibacteriana e hipocolesterolêmica;
- Estudar diferentes métodos de encapsulamento e aplicações destes hidrolisados em alimentos;
- Estudar o mecanismo de ação desses peptídeos na atividade hipocolesterolêmica;
- Realizar um estudo dos compostos fenólicos presentes nos hidrolisados e sua relação com a atividade antioxidante;
- Realizar a identificação aminoacídica dos peptídeos antioxidantes, antibacterianos e hipocolesterolêmicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, T. P.; NAKAMURA, L. K.; BUCHHOLZ, G.; WOLF, W. J.; PALMER, D. M.; GASDORF, H. J.; NELSEN, T. C.; KLEIMAN, R. Processes for making animal feed and protein isolates from jojoba meal. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, n. 1981, p. 1488–1493, 1991.
- ABDEL-HAMID, M.; GODA, H. A.; DE GOBBA, C.; JENSSEN, H.; OSMAN, A. Antibacterial activity of papain hydrolysed camel whey and its fractions. **International Dairy Journal**, v. 61, p. 91–98, 2016.
- ADLER-NISSEN, J. Enzymic hydrolysis of proteins for increased solubility. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 24, n. 6, p. 1090–1093, 1976.
- ADLER-NISSEN, J. **Enzymatic hydrolysis of food proteins**. London: Elsevier Applied Science Publishing, 1986.
- ALAIZ, M.; BEPPU, M.; OHISHI, K.; KIKUGAWA, K. Modification of delipidated apoprotein B of low density lipoprotein by lipid oxidation products in relation to macrophage scavenger receptor binding. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, n. 17, p. 51–57, 1994.
- ALASHI, A. M.; BLANCHARD, C. L.; MAILER, R. J.; AGBOOLA, S. O.; MAWSON, A. J.; HE, R.; GIRGIH, A.; ALUKO, R. E. Antioxidant properties of Australian canola meal protein hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 146, p. 500–506, mar. 2014.
- ALLER, R.; DE LUIS, D. A.; IZAOLA, O.; LA CALLE, F.; DEL OLMO, L.; FERNANDEZ, L.; ARRANZ, T.; GONZALEZ HERNANDEZ, J. M. Effect of soluble fiber intake in lipid and glucose levels in healthy subjects: A randomized clinical trial. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 65, n. 1, p. 7–11, 2004.
- ALLINGER, N. L. **Química Orgânica**. Segunda ed., 1976.
- ALUKO, R. E. The extraction and purification of protein: an introduction. 325–351 p. In: **Proteins in food processing**. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2004.
- 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.
- ANEIROS, A.; GARATEIX, A. Bioactive peptides from marine sources: Pharmacological properties and isolation procedures. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 803, n. 1, p. 41–53, 2004.
- ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P. D.; PATSALIDES, E.; MCDONALD, S.; ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. **The Analyst**, v. 127, n. 1, p. 183–198, 2002.
- ANWAR, A.; SALEEMUDDIN, M. Alkaline proteases: A review. **Bioresource Technology**, v. 64, n. 3, p. 175–183, 1998.

AOAC. **Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis of International. 17 th. 1 CD-ROM**, 2000.

AWARENET. **Handbook for the prevention and minimisation of waste and valorisation of by-products in European agro-food industries**, 2004.

AYERZA, R. Oil content and fatty acid composition of Chia (*Salvia hispanica* L.) from five northwestern locations in Argentina. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 72, n. 9, p. 1079–1081, 1995.

AYERZA, R. The seed's protein and oil content, fatty acid composition, and growing cycle length of a single genotype of chia (*Salvia hispanica* L.) as affected by environmental factors. **Journal of Oleo Science**, v. 58, n. 7, p. 347–354, 2009.

AYERZA, R.; COATES, W. Dietary levels of chia: influence on yolk cholesterol, lipid content and fatty acid composition for two strains of hens. **Poultry science**, v. 79, n. 5, p. 724–739, 2000.

AYERZA, R.; COATES, W. Composition of chia (*Salvia hispanica*) grown in six tropical and subtropical ecosystems of South America. **Tropical Science**, v. 44, n. 3, p. 131–135, 2004.

AYERZA, R.; COATES, W. Influence of environment on growing period and yield, protein, oil and α -linolenic content of three chia (*Salvia hispanica* L.) selections. **Industrial Crops and Products**, v. 30, n. 2, p. 321–324, 2009a.

AYERZA, R.; COATES, W. Some quality components of flor chia (*Salvia hispanica* L.) genotypes grown under tropical coastal desert ecosystem conditions. **Asian Journal of Plant Sciences**, v. 8, n. 4, p. 301–307, 2009b.

AYERZA, R.; COATES, W. Protein content, oil content and fatty acid profiles as potential criteria to determine the origin of commercially grown chia (*Salvia hispanica* L.). **Industrial Crops and Products**, v. 34, n. 2, p. 1366–1371, 2011.

BACCHI, L. C.; BATISTUTI, J. P. The effect of chickpea flour defatting by different organic solvents on protein solubility. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 15, p. 61–74, 1994.

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.

BARBUT, S. Determining water and fat holding. In: **Methods of Testing Protein Functionality**. [s.l.] London: Chapman & Hall, 1996. p. 265.

BARONI, M. V.; DI PAOLA NARANJO, R. D.; GARCÍA-FERREYRA, C.; OTAIZA, S.; WUNDERLIN, D. A. How good antioxidant is the red wine? Comparison of some in vitro and in vivo methods to assess the antioxidant capacity of Argentinean red wines. **LWT - Food Science and Technology**, v. 47, n. 1, p. 1–7, 2012.

BECHINGER, B.; LOHNER, K. Detergent-like actions of linear amphipathic cationic

antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1758, n. 9, p. 1529–1539, 2006.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70–76, 1996.

BERA, M. B.; MUKHERJEE, R. K. Solubility, Emulsifying, and Foaming Properties of Rice Bran Protein Concentrates. **Journal of Food Science**, v. 54, n. 1, p. 142–145, 1989.

BERGTHALLER, W., DIJKINK, B., LANGELAAN, H., & VEREIJKEN, J. **Protein from pea mutants as a co-product in starch separation. Isolates from wet and dry separation: Yield, composition and solubility.** [s.l.] Nahrung-Food, 2001.

BETANCUR-ANCONA, D.; SOSA-ESPINOZA, T.; RUIZ-RUIZ, J.; SEGURA-CAMPOS, M.; CHEL-GUERRERO, L. Enzymatic hydrolysis of hard-to-cook bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein concentrates and its effects on biological and functional properties. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 49, n. 1, p. 2–8, 2014.

BEUCHAT, L. R. Functional and electrophoretic characteristics of succinylated peanut flour protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 25, n. 2, p. 258–261, 1977.

BEVERUNG, C. J.; RADKE, C. J.; BLANCH, H. W. Protein adsorption at the oil/water interface: Characterization of adsorption kinetics by dynamic interfacial tension measurements. **Biophysical Chemistry**, v. 81, n. 1, p. 59–80, 1999.

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

BOSCHIN, G.; SCIGLIUOLO, G. M.; RESTA, D.; ARNOLDI, A. ACE-inhibitory activity of enzymatic protein hydrolysates from lupin and other legumes. **Food Chemistry**, v. 145, p. 34–40, 2014.

BOYE, J. I.; AKSAY, S.; ROUFIK, S.; RIB??REAU, S.; MONDOR, M.; FARNWORTH, E.; RAJAMOHAMED, S. H. Comparison of the functional properties of pea, chickpea and lentil protein concentrates processed using ultrafiltration and isoelectric precipitation techniques. **Food Research International**, v. 43, n. 2, p. 537–546, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010.

BRODY, T. **Nutrition biochemistry**. 2.ed. San ed., 1998. 1006 p.

BROWN, M. **Introduction to Thermal Analysis Thechiques and applications**. London, Chapman & Hall: [s.n.], 1998. 211 p.

BUCKLEY, D. J.; MORRISSEY, P. A.; GRAY, J. I. Influence of dietary vitamin-E on the oxidative stability and quality of pig meat. **Journal of Animal Science**, v. 73, n. 10, p. 3122–3130, 1995.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223–253, 2004.

BUSHWAY, A. A.; BELYEA, P. R.; BUSHWAY, R. J. Chia seed as a source of oil, polysaccharide, and protein. **Journal of Food Science**, v. 46, n. 5, p. 1349–1350, 1981.

BUSHWAY, A.; WILSON, A. M.; HOUSTON, L.; BUSHWAY, R. J. Selected properties of the lipid and protein fractions from chia seed. **Journal of Food Science**, v. 49, n. 2, p. 555–557, 1984.

BUSTAMANTE, M.; OOMAH, B. D.; RUBILAR, M.; SHENE, C. Effective *Lactobacillus plantarum* and *Bifidobacterium infantis* encapsulation with chia seed (*Salvia hispanica* L.) and flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) mucilage and soluble protein by spray drying. **Food Chemistry**, v. 216, p. 97–105, 2017.

CABANOS, C.; EKYU, A.; AMARI, Y.; KATO, N.; KURODA, M.; NAGAOKA, S.; TAKAIWA, F.; UTSUMI, S.; MARUYAMA, N. High-level production of lactostatin, a hypocholesterolemic peptide, in transgenic rice using soybean A1aB1b as carrier. **Transgenic Research**, v. 22, n. 3, p. 621–629, 2013.

CAPITANI, M. I.; SPOTORNO, V.; NOLASCO, S. M.; TOMÁS, M. C. Physicochemical and functional characterization of by-products from chia (*Salvia hispanica* L.) seeds of Argentina. **LWT - Food Science and Technology**, v. 45, n. 1, p. 94–102, 2012.

CAPUANO, D. M.; LAZZARINI, M. P. T.; JÚNIOR, E. G.; TAKAYANAGUI, O. M. Enteroparasitoses em manipuladores de alimentos do município de Ribeirão Preto – SP, Brasil, 2000. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 11, n. 4, p. 687–695, 2008.

CARBONARO, M.; MASELLI, P.; DORE, P.; NUCARA, A. Application of Fourier transform infrared spectroscopy to legume seed flour analysis. **Food Chemistry**, v. 108, n. 1, p. 361–368, 2008.

CHAU, C. F.; HUANG, Y. L. Comparison of the chemical composition and physicochemical properties of different fibers prepared from the peel of *Citrus sinensis* L. Cv. Liucheng. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 9, p. 2615–2618, 2003.

CHEFTEL, J. C.; CUQ, J. L.; LORIENT, D. **Proteins alimentarias: bioquímica, propiedades funcionales, valor nutritivo, modificaciones químicas**. Zaragoza: Acribia: [s.n.], 1989.

CHEN, Z.; BERTIN, R.; FROLDI, G. EC50 estimation of antioxidant activity in DPPH center dot assay using several statistical programs. **Food Chemistry**, v. 138, n. 1, p. 414–420, 2013.

CHENG, X.; TANG, X.; WANG, Q.; MAO, X. Y. Antibacterial effect and hydrophobicity of yak κ -casein hydrolysate and its fractions. **International Dairy Journal**, v. 31, n. 2, p. 111–116, 2013.

CHENG, Z.; MOORE, J.; YU, L. High-throughput relative DPPH radical scavenging capacity assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 20, p. 7429–7436, 2006.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eighth Edition.** CLSI document M2-A8 (ISBN 1-56238- 485- 6). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA. [s.l: s.n.], 2003.

CLSI. **M02-A12: Performance Standards for Antimicrobial Disk 996 Susceptibility Tests;** Approved Standard—Twelfth Edition. CLSI (Clinical and Laboratory 2073 Standards Institute), 35(1), 2015a.

CLSI. **M07-A10: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for 1646 Bacteria That Grow Aerobically;** Approved Standard—Tenth Edition. CLSI 1647 (Clinical Lab. Stand. Institute) 35, 2015b.

COELHO, M. S.; SALAS-MELLADO, M. Biological properties of chia (*Salvia hispanica* L.) proteins. In: BETANCUR-ANCONA, D.; SEGURA-CAMPOS, M. R. (Eds.). ***Salvia Hispanica L.: Properties, Applications and Health.*** [s.l: s.n.]. p. 1–345, 2015.

COELHO, M. S.; SALAS-MELLADO, M. DE LAS M. Chemical Characterization of CHIA (*Salvia hispanica* L.) for Use in Food Products. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 2, n. 5, p. 263–269, 2014.

CORETA-GOMES, F. M.; VAZ, W. L. C.; WASIELEWSKI, E.; GERALDES, C. F. G. C.; JOÃO, M. Quantification of cholesterol solubilized in bile salt micellar aqueous solutions using C nuclear magnetic resonance. **Analytical biochemistry**, v. 427, n. 1, p. 41–48, 2012.

COSKUN, A.; SERTESER, M.; UNSAL, I. Inhibition of Cholesterol Biosynthesis in Hypercholesterolemia – Is It the Right Choice? **Journal of Medical Biochemistry**, v. 32, n. 1, p. 16–19, 2013.

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, p. 217–246, 2001.

COX, S. D.; MANN, C. M.; MARKHAM, J. L.; BELL, H. C.; GUSTAFSON, J. E.; WARMINGTON, J. R.; WYLLIE, S. G. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (Tea tree oil). **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 1, p. 170–175, 2000.

DA SILVA, B. P.; DIAS, D. M.; DE CASTRO MOREIRA, M. E.; TOLEDO, R. C. L.; DA MATTA, S. L. P.; LUCIA, C. M. DELLA; MARTINO, H. S. D.; PINHEIRO-SANT’ANA, H. M. Chia seed shows good protein quality, hypoglycemic effect and improves the lipid profile and liver and intestinal morphology of Wistar rats. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 71, n. 3, p. 225–230, 2016.

DAMODARAN, S. Food proteins: an overview. In: DAMODARAN, S.; PARAF, A. (Eds.). **Food Proteins and Their Applications.** New York: Marcel Dekker: [s.n.], 1997.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de los Alimentos de Fennema.** Artmed ed. [s.l: s.n.], 2010. 900p.

DANIELLS, S. **Chia boom: With 239% growth, chia category set to hit \$1 bn by 2020.**

Super grains! From chia to quinoa. Disponível em: <<http://www.foodnavigator-usa.com/Markets/Chia-boom-With-239-growth-chia-category-set-to-hit-1-bn-by-2020>>. Acesso em: 3 maio. 2017.

DAREWICZ, M.; DZIUBA, J.; DZIUBA, M. Functional Properties and Biological Activities of Bovine Casein Proteins and Peptides. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 1556, n. 1, p. 79–86, 2006.

DE FALCO, B.; AMATO, M.; LANZOTTI, V. Chia seeds products: an overview. **Phytochemistry Reviews**, v. 16, n. 4, p. 745–760, 2017.

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. **Microscopia eletrônica de varredura _ aplicações e preparação de amostras**. Porto Aleg ed. [s.l: s.n.], 2007.

DHAVAL, A.; YADAV, N.; PURWAR, S. Potential applications of food derived bioactive peptides in management of health. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 22, n. 3, p. 377–398, 2016.

DI MAMBRO, V. M.; MARQUELE, F. D.; FONSECA, M. J. V. Avaliação *in vitro* da ação antioxidante em formulações antienvhecimento. **Cosmetics & Toiletries**, v. 17, n. 4, p. 74–78, 2005.

DI PAOLA NARANJO, R. D.; OTAIZA, S.; SARAGUSTI, A. C.; BARONI, V.; CARRANZA, A. D. V.; PERALTA, I. E.; VALLE, E. M.; CARRARI, F.; ASIS, R. Hydrophilic antioxidants from Andean tomato landraces assessed by their bioactivities in vitro and in vivo. **Food Chemistry**, v. 206, p. 146–155, 2016.

DOS SANTOS, M. H.; BATISTA, B. L.; DUARTE, S. M. D. S.; DE ABREU, C. M. P.; GOUVÊA, C. M. C. P. Influência do processamento e da torrefação sobre a atividade antioxidante do café (*Coffea arabica*). **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 604–610, 2007.

DRAPALA, K. P.; AUTY, M. A. E.; MULVIHILL, D. M.; O'MAHONY, J. A. Influence of lecithin on the processing stability of model whey protein hydrolysate-based infant formula emulsions. **International Journal of Dairy Technology**, v. 68, n. 3, p. 322–333, 2015.

FABIAN, H.; SCHULTZ, C.; BACKMANN, J.; HAHN, U.; SAENGER, W.; MANTSCH, H. H.; NAUMANN, D. Impact of point mutations on the structure and thermal stability of Ribonuclease T1 in aqueous solution probed by F. T. IR Spectroscopy. **Biochemistry**, v. 33, n. Figure 1, p. 10725, 1994.

FAO/WHO/UNU. Protein and amino acids requirements in human nutrition. WHO Tech. Report Ser. 2008, No. 935, 135–183, 247–248.

FEYZI, S.; MILANI, E.; GOLIMOVAAHED, Q. A. Grass pea (*Lathyrus sativus* L.) protein isolate: The effect of extraction optimization and drying methods on the structure and functional properties. **Food hydrocolloids**, v. 74, p. 187–196, 2018.

FERREIRA, C. D.; ZIEGLER, V.; LINDEMANN, I. S.; HOFFMANN, J. F.; VANIER, N. L.; OLIVEIRA, M. Quality of black beans as a function of long-term storage and moldy development: Chemical and functional properties of flour and isolated protein. Food

Chemistry, v. 246, p. 473–480, 2018.

FORATO, L. A.; BERNARDES FILHO, R.; COLNAGO, L. A. Estudo de métodos de aumento de resolução de espectros de FTIR para análise de estruturas secundárias de proteínas. **Química Nova**, v. 21, n. 2, p. 146–150, 1998.

FRASSINETTI, S.; DELLA CROCE, C. M.; CALTAVUTURO, L.; LONGO, V. Antimutagenic and antioxidant activity of Lisosan G in *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 2029–2034, 2012.

FROTA KDE, M.; DOS SANTOS FILHO, R. D.; RIBEIRO, V. Q.; AREAS, J. A. Cowpea protein reduces LDL-cholesterol and apolipoprotein B concentrations, but does not improve biomarkers of inflammation or endothelial dysfunction in adults with moderate hypercholesterolemia. **Nutricion Hospitalaria**, v. 31, n. 4, p. 1611–1619, 2015.

FUGE, E. F.; WERNER-WASHBURN, M. Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: HOHMANN, S.; MAGER, W. H. (Eds.). **Yeast Stress Responses**, New York: Springer. [s.l: s.n.]. p. 53–74, 1997.

FUKUSHIMA, D. Structures of plant storage proteins and their function. **Food Reviews International**, v. 7, p. 353–381, 1991.

GAGNAIRE, V.; CARPINO, S.; PEDILIGGIERI, C.; JARDIN, J.; LORTAL, S.; LICITRA, G. Uncommonly thorough hydrolysis of peptides during ripening of ragusano cheese revealed by tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 23, p. 12443–12452, 2011.

GARCIA-MORA, P.; PEÑAS, E.; FRIAS, J.; GOMEZ, R.; MARTINEZ-VILLALUENGA, C. High-pressure improves enzymatic proteolysis and the release of peptides with angiotensin I converting enzyme inhibitory and antioxidant activities from lentil proteins. **Food Chemistry**, v. 171, p. 224–232, 2015.

GARCÍA-MORENO, P. J.; BATISTA, I.; PIRES, C.; BANDARRA, N. M.; ESPEJO-CARPIO, F. J.; GUADIX, A.; GUADIX, E. M. Antioxidant activity of protein hydrolysates obtained from discarded Mediterranean fish species. **Recovery and Utilization of Valuable Compounds from Food Processing By-products**, v. 65, Part C, p. 469–476, 2014.

GAUTHIER, S. F.; PAQUIN, P.; POULIOT, Y.; TURGEON, S. Surface Activity and Related Functional Properties of Peptides Obtained from Whey Proteins. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n. 1, p. 321–328, 1993.

GHRIBI, A. M.; GAFSI, I. M.; SILA, A.; BLECKER, C.; DANTHINE, S.; ATTIA, H.; BOUGATEF, A.; BESBES, S. Effects of enzymatic hydrolysis on conformational and functional properties of chickpea protein isolate. **Food Chemistry**, v. 187, p. 322–330, 2015.

GIMÉNEZ, B.; ALEMÁN, A.; MONTERO, P.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. Antioxidant and functional properties of gelatin hydrolysates obtained from skin of sole and squid. **Food Chemistry**, v. 114, n. 3, p. 976–983, 2009.

GOUFO, P.; TRINDADE, H. Rice antioxidants: phenolic acids, flavonoids, anthocyanins, proanthocyanidins, tocopherols, tocotrienols, γ -oryzanol, and phytic acid. **Food Science & Nutrition**, v. 2, n. 2, p. 75–104, 2014.

GRANT, C. M.; COLLINSON, L. P.; ROE, J. H.; DAWES, I. W. Yeast glutathione reductase is required for protection against oxidative stress and is a target gene for yAP-1 transcriptional regulation. **Molecular Microbiology**, v. 21, p. 171–179, 1996.

GRAVELAND, A.; BONGERS, P.; BOSVELD, P. Extraction and fractionation of wheat flour proteins. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 30, n. 1, p. 71–84, 1979.

GRIFFIN, P.M.; TAUXE, R.V. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli* and the associated hemolytic uremic syndrome. **Epidemiologic Reviews**, v.13, p.60-98, 1991.

GRIGOROVICH, N. V; MOISEENKO, D. V; ANTIPOVA, A. S.; ANOKHINA, M. S.; BELYAKOVA, L. E.; POLIKARPOV, Y. N.; KORICA, N.; SEMENOVA, M. G.; BARANOV, B. A. Structural and thermodynamic features of covalent conjugates of sodium caseinate with maltodextrins underlying their functionality. **Food & Function**, v. 3, n. 3, p. 283–289, 2012.

GUADIX, A. Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. **Ars Pharmaceutica**, v. 41, n. 1, p. 79–89, 2000.

GUEVARA-CRUZ, M.; TOVAR, A. R.; AGUILAR-SALINAS, C. A.; MEDINA-VERA, I.; GIL-ZENTENO, L.; HERNANDEZ-VIVEROS, I.; LOPEZ-ROMERO, P.; ORDAZ-NAVA, G.; CANIZALES-QUINTEROS, S.; GUILLÉN PINEDA, L. E.; TORRES, N. A Dietary Pattern Including Nopal, Chia Seed, Soy Protein, and Oat Reduces Serum Triglycerides and Glucose Intolerance in Patients with Metabolic Syndrome. **Journal of Nutrition**, v. 142, n. 1, p. 64–69, 2012.

HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants, and human disease: Curiosity, cause, or consequence? **Lancet**, v. 344, n. 8924, p. 721–724, 1994.

HALVORSEN, B. L.; HOLTE, K.; MARI, C. W.; BARIKMO, I.; HVATTUM, E.; REMBERG, S. F.; WOLD, A.; HAFFNER, K.; BAUGERØD, H.; ANDERSEN, L. F.; MOSKAUG, J. O.; JACOBS, D. R.; BLOMHOFF, R. A systematic screening of total antioxidants in dietary plants. **American Society for Nutritional Sciences**, v. 132, p. 461–471, 2002.

HAMMERSHØJ, M.; NEBEL, C.; CARSTENS, J. H. Enzymatic hydrolysis of ovomucin and effect on foaming properties. **Food Research International**, v. 41, n. 5, p. 522–531, 2008.

HANEY, E. F.; PETERSEN, A. P.; LAU, C. K.; JING, W.; STOREY, D. G.; VOGEL, H. J. Mechanism of action of pueroindoline derived tryptophan-rich antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1828, n. 8, p. 1802–1813, 2013.

HARWALKAR, V. R.; MA, C.-Y. Study of thermal properties of oat globulin by differential scanning calorimetry. **Journal of Food Science**, v. 52, n. 2, p. 394–398, 1987.

HE, R.; GIRGIH, A. T.; MALOMO, S. A.; JU, X.; ALUKO, R. E. Antioxidant activities of

enzymatic rapeseed protein hydrolysates and the membrane ultrafiltration fractions. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 1, p. 219–227, 2013.

HERNÁNDEZ, L. M. **Mucilage from chia seeds (*Salvia hispanica*): microestructure, physico-chemical characterization and applications in food industry**. Thesis, Po ed. [s.l: s.n.], 2012. 120p.

HERRERO, E.; ROS, J.; BELLÍ, G.; CABISCOL, E. Redox control and oxidative stress in yeast cells. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1780, n. 11, p. 1217–1235, 2008.

HU, F.; WU, Q.; SONG, S.; SHE, R.; ZHAO, Y.; YANG, Y.; ZHANG, M.; DU, F.; SOOMRO, M. H.; SHI, R. Antimicrobial activity and safety evaluation of peptides isolated from the hemoglobin of chickens. **BMC Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 1–10, 2016.

HUANG, D.; BOXIN, O. U.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841–1856, 2005.

HUANG, H. W. Action of antimicrobial peptides: Two-state model. **Biochemistry**, v. 39, n. 29, p. 8347–8352, 2000.

HUEBNER, F. R.; BIETZ, J. A.; WEBB, B. D.; JULIANO, B. O. Rice cultivar identification by high-performance liquid chromatography of endosperm proteins. **Cereal Chemistry**, v. 67, n. 2, p. 129–135, 1990.

HWANG, C.; CHEN, Y.; LUO, C.; CHIANG, W. Original article Antioxidant and antibacterial activities of peptide fractions from flaxseed protein hydrolysed by protease from *Bacillus altitudinis*. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 51, p. 681–689, 2016.

HWANG, J. Y.; SHYU, Y. S.; WANG, Y. T.; HSU, C. K. Antioxidative properties of protein hydrolysate from defatted peanut kernels treated with esperase. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 2, p. 285–290, 2010.

IKONEN, E. V Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. **Nature Reviews**, p. 125–138, v. 9, 2008.

INOUE, Y.; MATSUDA, T.; SUGIYAMA, K.; IZAWA, S.; KIMURA, A. Genetic analysis of glutathione peroxidase in oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 27002–27009, 1999.

INTARASIRISAWAT, R.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; WU, J. Antioxidative and functional properties of protein hydrolysate from defatted skipjack (*Katsuwonus pelamis*) roe. **Food Chemistry**, v. 135, n. 4, p. 3039–3048, 2012.

ISTVAN, E. S.; DEISENHOFER, J. Structural Mechanism for Statin Inhibition of HMG-CoA Reductase. **Science**, v. 292, n. 5519, p. 1160–1164, 2001.

IVANOV, V. T.; KARELIN, A. A.; PHILIPPOVA, M. M.; NAZIMOV, I. V.; PLETNEV, V. Z. Hemoglobin as a source of endogenous bioactive peptides: The concept of tissue-specific

peptide pool. **Biopolymers - Peptide Science Section**, v. 43, n. 2, p. 171–188, 1997.

IXTAINA, V. Y.; MARTÍNEZ, M. L.; SPOTORNO, V.; MATEO, C. M.; MAESTRI, D. M.; DIEHL, B. W. K.; NOLASCO, S. M.; TOMÁS, M. C. Characterization of chia seed oils obtained by pressing and solvent extraction. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, n. 2, p. 166–174, 2011.

JAHANBANI, R.; GHAFFARI, S. M.; SALAMI, M.; VAHDATI, K.; SEPEHRI, H.; SARVESTANI, N. N.; SHEIBANI, N.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A. Antioxidant and anticancer activities of walnut (*Juglans regia* L.) protein hydrolysates using different proteases. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 71, n. 4, p. 402–409, 2016.

JAMDAR, S. N.; RAJALAKSHMI, V.; PEDNEKAR, M. D.; JUAN, F.; YARDI, V.; SHARMA, A. Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate. **Food Chemistry**, v. 121, n. 1, p. 178–184, 2010.

JAMIESON, D. J. Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 14, p. 1511–1527, 1998.

JAMIESON, D. J.; RIVERS, S. L.; STEPHEN, D. W. S. Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* proteins induced by peroxide and superoxide stress. **Microbiology**, v. 140, p. 3277–3283, 1994.

JANE, E. D., RIVAS, N. R., & JOHN, C. Selected functional properties of sesame flour and two protein isolates. **Journal of Science, Food and Agriculture**, v. 32, p. 557–564, 1981.

JENSSEN, H.; HAMILL, P.; HANCOCK, R. E. W. Peptide antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 3, p. 491–511, 2006.

JONES, G. M.; STALKER, J.; HUMPHRAY, S.; WEST, A.; COX, T.; ROGERS, J.; DUNHAM, I.; PRELICH, G. **A systematic library for comprehensive overexpression screens in *Saccharomyces cerevisiae***. [s.l.] Nature Methods In press, 2008.

JOSHI, M.; ADHIKARI, B.; ALDRED, P.; PANOZZO, J. F.; KASAPIS, S. Physicochemical and functional properties of lentil protein isolates prepared by different drying methods. **Food Chemistry**, v. 129, n. 4, p. 1513–1522, 2011.

KARAMAĆ, M.; KOSIŃSKA-CAGNAZZO, A.; KULCZYK, A. Use of different proteases to obtain flaxseed protein hydrolysates with antioxidant activity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 7, 2016.

KIMATU, B. M.; ZHAO, L.; BIAO, Y.; MA, G.; YANG, W.; PEI, F.; HU, Q. Antioxidant potential of edible mushroom (*Agaricus bisporus*) protein hydrolysates and their ultrafiltration fractions. **Food Chemistry**, v. 230, p. 58–67, 2017.

KINSELLA, J. E. Functional Properties of Soy Proteins. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 56, 1979.

KINSELLA, J.; MELACHOURIS, N. Functional properties of proteins in food: A survey.

Critical Reviews in Food Science and Nutrition, v. 7, n. 3, p. 219–280, 1976.

KLOMPONG, V.; BENJAKUL, S.; KANTACHOTE, D.; SHAHIDI, F. Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. **Food Chemistry**, v. 102, n. 4, p. 1317–1327, 2007.

KOBBI, S.; BALTI, R.; BOUGATEF, A.; LE FLEM, G.; FIRDAOUS, L.; BIGAN, M.; CHATAIGNÉ, G.; CHAABOUNI, S.; DHULSTER, P.; NEDJAR, N. Antibacterial activity of novel peptides isolated from protein hydrolysates of *RuBisCO* purified from green juice alfalfa. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 703–713, 2015.

KONG, B.; XIONG, Y. L. Antioxidant activity of zein hydrolysates in a liposome system and the possible mode of action. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 16, p. 6059–6068, 2006.

KOU, X.; GAO, J.; ZHANG, Z.; WANG, H.; WANG, X. Purification and identification of antioxidant peptides from chickpea (*Cicer arietinum* L.) albumin hydrolysates. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, n. 2, p. 591–598, 2013.

KRAJCOVICOVA-KDULACKOVA, M.; BABINSKA, K.; VALACHOVICOVA, M. Health benefits and risks of plant proteins. **Bratislavske Lekarske Listy**, v. 106, n. 6–7, p. 231, 2005.

KRISTINSSON, H. G.; RASCO, B. A. Biochemical and functional properties of atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins hydrolyzed with various alkaline proteases. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 3, p. 657–666, 2000a.

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, 2000b.

KUMAGAI, H. Chemical and enzymatic protein modifications and functionality enhancement. In: HETTIARACHCHY, N. S.; SATO, K.; MARSHALL, M. R.; KANNAN, A. (Eds.). **Food proteins and peptides: chemistry, functionality, interactions, and commercialization**. Boca Raton, Florida USA: CRC Press.: [s.n.]. p. 165–197, 2012.

KUMAR, D.; CHATLI, M. K.; SINGH, R.; MEHTA, N.; KUMAR, P. Effects of incorporation of camel milk casein hydrolysate on quality, oxidative and microbial stability of goat meat emulsion during refrigerated (4 ± 1 °C) storage. **Small Ruminant Research**, v. 144, p. 149–157, 2016a.

KUMAR, D.; CHATLI, M. K.; SINGH, R.; MEHTA, N.; KUMAR, P. Antioxidant and antimicrobial activity of camel milk casein hydrolysates and its fractions. **Small Ruminant Research**, v. 139, p. 20–25, 2016b.

KURUKJI, D.; NORTON, I.; SPYROPOULOS, F. Fabrication of sub-micron protein-chitosan electrostatic complexes for encapsulation and pH-Modulated delivery of model hydrophilic active compounds. **Food Hydrocolloids**, v. 53, p. 249–260, 2016.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; TRONCOSO, A. M.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 726–732, 2005.

KYLE, S.; AGGELI, A.; INGHAM, E.; MCPHERSON, M. J. Production of self-assembling biomaterials for tissue engineering. **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 7, p. 423–433, 2009.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.

LAPSONGPHON, N.; YONGSAWATDIGUL, J. Production and purification of antioxidant peptides from a mungbean meal hydrolysate by *Virgibacillus* sp. SK37 proteinase. **Food Chemistry**, v. 141, n. 2, p. 992–999, 2013.

LEE, J.; KOO, N.; MIN, D. B. Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 3, n. 1, p. 21–33, 2004.

LICEAGA-GESUALDO, A. M.; LI-CHAN, E. C. Y. Functional properties of fish protein hydrolysate from herring (*Clupea harengus*). **Journal of Food Science**, v. 64, n. 6, p. 1000–1004, 1999.

LIMA, E.; ABDALLA, D. Peroxidação lipídica : mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, n. January 2001, 2001.

LIN, C. S.; ZAYAS, J. F. Functionality of defatted corn germ proteins in a model system: fat binding capacity and water retention. **Journal of Food Science**, v. 52, n. 5, p. 1308–1311, 1987.

LIN, K. Y.; DANIEL, J. R.; WHISTLER, R. L. Structure of chia seed polysaccharide exudate. **Carbohydrate Polymers**, v. 23, n. 1, p. 13–18, 1994.

LIU, R. A.; FINLEY, J. Potential cell culture models for antioxidant research. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4311–4314, 2005.

LONGO, V. D.; GRALLA, E. B.; VALENTINE, J. S. Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*: Mitochondrial production of toxic oxygen species in vivo. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 21, p. 12275–12280, 1996.

LÓPEZ, G.; ROS, G.; RINCÓN, F.; PERIAGO, M. J.; MARTÍNEZ, M. C.; ORTUÑO, J. Relationship between physical and hydration properties of soluble and insoluble fiber of artichoke. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 9, p. 2773–2778, 1996.

LORIAN, V. **Antibiotics in Laboratory Medicine**. 5 ed. Phil ed. [s.l: s.n.], 2005.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, L.; RANDALL, R. J.; RANDALL, R. J. Article : Protein Measurement With the Folin Phenol Reagent. 1951.

LUCAS, E.; SOARES, B.; MONTEIRO, E. **Caracterização de Polímeros: determinação**

do peso molecular e análise térmica. e-paper ed. Rio de Janeiro: [s.n.], 2001.

LULE, V. K.; GARG, S.; POPHALY, S. D.; HITESH; TOMAR, S. K. Potential health benefits of lunasin: A multifaceted soy-derived bioactive peptide. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 3, p. C485–C494, 2015.

LUNA PIZARRO, P.; ALMEIDA, E. L.; SAMMÁN, N. C.; CHANG, Y. K. Evaluation of whole chia (*Salvia hispanica* L.) flour and hydrogenated vegetable fat in pound cake. **LWT - Food Science and Technology**, v. 54, n. 1, p. 73–79, 2013.

MA, Z.; BOYE, J. I.; SIMPSON, B. K. Preparation of salad dressing emulsions using lentil, chickpea and pea protein isolates: A response surface methodology study. **Journal of Food Quality**, v. 39, n. 4, p. 274–291, 2016.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Brock biology of microorganisms**. 10. ed. Up ed. [s.l: s.n.], 2003.

MAHMOUD, M. I. Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutritional products. **Food Technology**, v. 48, p. 89–95, 1994.

MAKRI, E. A.; DOXASTAKIS, G. I. Emulsifying and foaming properties of Phaseolus vulgaris and coccineus proteins. **Food Chemistry**, v. 98, n. 3, p. 558–568, 2006.

MALAKI NIK, A.; WRIGHT, A. J.; CORREDIG, M. Interfacial design of protein-stabilized emulsions for optimal delivery of nutrients. **Food & function**, v. 1, n. 2, p. 141–148, 2010.

MARCONE, M. F.; KAKUDA, Y. A comparative study of the functional properties of amaranth and soybean globulin isolates. **Nahrung - Food**, v. 43, n. 6, p. 368–373, 1999.

MARINELI, R. DA S.; MORAES, ÉRICA AGUIAR; LENQUISTE, S. A.; GODOY, A. T.; EBERLIN, M. N.; MAR??STICA, M. R. Chemical characterization and antioxidant potential of Chilean chia seeds and oil (*Salvia hispanica* L.). **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, n. 2P2, p. 1304–1310, 2014.

MARQUES, M. R.; FONTANARI, G. G.; PIMENTA, D. C.; SOARES-FREITAS, R. M.; ARÊAS, J. A. G. Proteolytic hydrolysis of cowpea proteins is able to release peptides with hypocholesterolemic activity. **Food Research International**, v. 77, p. 43–48, 2015a.

MARQUES, M. R.; SOARES FREITAS, R. A. M.; CORRÊA CARLOS, A. C.; SIGUEMOTO, É. S.; FONTANARI, G. G.; ARÊAS, J. A. G. Peptides from cowpea present antioxidant activity, inhibit cholesterol synthesis and its solubilisation into micelles. **Food Chemistry**, v. 168, p. 288–293, 2015b.

MARTÍNEZ, M. L.; MARÍN, M. A.; SALGADO FALLER, C. M.; REVOL, J.; PENCI, M. C.; RIBOTTA, P. D. Chia (*Salvia hispanica* L.) oil extraction: Study of processing parameters. **LWT - Food Science and Technology**, v. 47, n. 1, p. 78–82, 2012.

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, n. 5, p. 2077–2085, 2011.

MATHEW, A.; YOSHIDA, Y.; MAEKAWA, T.; SAKTHI KUMAR, D. Alzheimer's disease: Cholesterol a menace? **Brain Research Bulletin**, v. 86, n. 1–2, p. 1–12, 2011.

MECHIE, S. C.; CHAPMAN, P. A.; SIDDON, C. A. A fifteen month study of *Escherichia coli* O157:H7 in a dairy herd. **Epidemiology & Infection**, v. 188, p. 17–25, 1997.

MEHDI, K.; PENNINGTON, M. J. An important role for glutathione and glutamyltranspeptidase in the supply of growth requirements during nitrogen starvation of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology**, p. 1885–1889, 1997.

MENGA, V.; AMATO, M.; PHILLIPS, T. D.; ANGELINO, D.; MORREALE, F.; FARES, C. Gluten-free pasta incorporating chia (*Salvia hispanica* L.) as thickening agent: An approach to naturally improve the nutritional profile and the in vitro carbohydrate digestibility. **Food Chemistry**, v. 221, p. 1954–1961, 2017.

MILLER, R.; GRONINGER, S. Functional Properties of Enzyme-Modified Acylated Fish Protein Derivatives. **Journal of Food Science**, v. 41, p. 268–272, 1976.

MONROY-TORRES, R.; MANCILLA-ESCOBAR, M. L.; GALLAGA-SOLÓRZANO, J. C.; MEDINA-GODOY, S.; SANTIAGO-GARCÍA, E. J. Protein digestibility of chia seed *Salvia hispanica* L. **Revista Salud Pública y Nutrición**, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2008.

MULCAHY, E. M.; MULVIHILL, D. M.; O'MAHONY, J. A. Physicochemical properties of whey protein conjugated with starch hydrolysis products of different dextrose equivalent values. **International Dairy Journal**, v. 53, p. 20–28, 2016.

MUÑOZ, L. A.; AGUILERA, J. M.; RODRIGUEZ-TURIENZO, L.; COBOS, A.; DIAZ, O. Characterization and microstructure of films made from mucilage of *Salvia hispanica* and whey protein concentrate. **Journal of Food Engineering**, v. 111, n. 3, p. 511–518, 2012.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. 7^a ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. 888p.

MUSZYŃSKA, B.; GRZYWACZ-KISIELEWSKA, A.; KAŁA, K.; GDULA-ARGASIŃSKA, J. Anti-inflammatory properties of edible mushrooms: A review. **Food Chemistry**, v. 243, n. July 2017, p. 373–381, 2018.

NAGATANI, T.; SAITO S.; SATO, M.; YAMADA, M. Development of an ultra high resolution scanning electron microscope by means of a field emission source and in-lens system. **Scanning Microscopy**, v. 11, p. 901–909, 1987.

NAKAI S.; LI-CHAN, E. **Chemical and Enzymatic Modifications of Milk Proteins in: Developments in Dairy Chemistry 4 Functional milk proteins**, Fox, P. F., New York. 1989, 347– 376pp.

NAKATSUJI, T.; GALLO, R. L. Antimicrobial Peptides: Old Molecules with New Ideas. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 132, n. 3, p. 887–895, 2012.

NAOZUKA, J.; OLIVEIRA, P. V. Cu, Fe, Mn and Zn distribution in protein fractions of Brazil-nut, cupuassu seed and coconut pulp by solid-liquid extraction and electrothermal atomic absorption spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 8, p. 1547–1553, 2007.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Bacteriological Analytical Manual (Chapter 4A)**, v. 163, n. i, p. 142–201, 2011.

NAZZARO, F.; FRATIANNI, F.; DE MARTINO, L.; COPPOLA, R.; DE FEO, V. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals**, v. 6, n. 12, p. 1451–1474, 2013.

NDHLALA, A. R.; MOYO, M.; VAN STADEN, J. Natural antioxidants: Fascinating or mythical biomolecules? **Molecules**, v. 15, n. 10, p. 6905–6930, 2010.

NEKLYUDOV, A. D.; IVANKIN, A. N.; BERDUTINA, A. V. Properties and uses of protein hydrolysates (Review). **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 36, n. 5, p. 452–459, 2000.

NIKI, E.; YOSHIDA, Y.; SAITO, Y.; NOGUCHI, N. Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 338, p. 668–676, 2005.

NOLSØE, H.; UNDELAND, I. The acid and alkaline solubilization process for the isolation of muscle proteins: State of the art. **Food and Bioprocess Technology**, v. 2, n. 1, p. 1–27, 2009.

NOVO NORDISK, A. **Alcalase. Enzyme business, B-259e-GB 2000**. [s.l: s.n.], 1994.

NOVO NORDISK, A. **Alcalase Food Grade, Scandinávia, Enzyme business, Product Sheet**, [s.l: s.n.], 1996

NUNES, M. C.; BATISTA, A. P.; RAYMUNDO, A.; ALVES, M. M.; SOUSA, I. Vegetable proteins and milk puddings. **Colloids and Surfaces**, v. 31, p. 21–29, 2003.

O'CONNELL, J. E.; FLYNN, C. The manufacture and application of casein-derived ingredients. In: HUI, Y. H. (Ed.). **Handbook of Food Products Manufacturing**. New Jersey: John Wiley & Sons: [s.n.], p. 557–593, 2007.

O'SULLIVAN, J.; ARELLANO, M.; PICHOT, R.; NORTON, I. The effect of ultrasound treatment on the structural, physical and emulsifying properties of dairy proteins. **Food Hydrocolloids**, v. 42, p. 386–396, 2014.

O'SULLIVAN, J. J.; O'MAHONY, J. A. **Food Ingredients**. Reference Module in Food Science. **Anais...**2016

O'KEEFE, S. F.; WANG, H. Effects of peanut skin extract on quality and storage stability of beef products. **Meat Science**, v. 73, n. 2, p. 278–286, 2006.

OLIVOS-LUGO, B. L.; VALDÍVIA-LOPES, M. A.; TECANTE, A. Thermal and physicochemical properties and nutritional value of the protein fraction of mexican chia seed

(*Salvia hispanica* L.). **Food Science and Technology International**, v. 16, n. 1, p. 89–96, 2010.

ONUH, J. O.; GIRGIH, A. T.; ALUKO, R. E.; ALIANI, M. In vitro antioxidant properties of chicken skin enzymatic protein hydrolysates and membrane fractions. **Food Chemistry**, v. 150, p. 366–373, maio 2014.

ORDÓÑEZ, J. A. **Tecnología de Alimentos**. Porto Alegre: Artmed: [s.n.], 2005.

ORONA-TAMAYO, D.; VALVERDE, M. E.; NIETO-RENDÓN, B.; PAREDES-LOPEZ, O. Inhibitory activity of chia (*Salvia hispanica* L.) protein fractions against angiotensin I-converting enzyme and antioxidant capacity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, n. 1, p. 236–242, 2015.

ORTIZ-MARTINEZ, M.; OTERO-PAPPATHEODOROU, J. T.; SERNA-SALDÍVAR, S. O.; GARCÍA-LARA, S. Antioxidant activity and characterization of protein fractions and hydrolysates from normal and quality protein maize kernels. **Journal of Cereal Science**, v. 76, p. 85–91, 2017.

OSBORNE, B. G. **Near-infrared Spectroscopy in Food Analysis**. Encycloped ed. [s.l: s.n.], 2000.

OSMAN, A.; GODA, H. A.; ABDEL-HAMID, M.; BADRAN, S. M.; OTTE, J. Antibacterial peptides generated by Alcalase hydrolysis of goat whey. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 480–486, 2016.

OSMAN, A. O. ; MAHGOUB, S. A. ; SITOHY, M. Z. . Preservative action of 11S (glycinin) and 7S (β -conglycinin) soy globulin on bovine raw milk stored either at 4 or 25 °C. **Journal of Dairy Research**, v. 80, n. 2, p. 174–183, 2013.

OTTO, T.; BAIK, B. K.; CZUCHAJOWSKA, Z. Wet fractionation of garbanzo bean and pea flours. **Cereal Chemistry**, v. 74, p. 141–146, 1997.

PAK, V. V.; KOO, M.; KWON, D. Y.; SHAKHIDOYATOV, K. M.; YUN, L. Peptide fragmentation as an approach in modeling of an active peptide and designing a competitive inhibitory peptide for HMG-CoA reductase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 12, p. 4300–4309, 2010.

PAK, V. V.; KOO, M. S.; KASYMOVA, T. D.; KWON, D. Y. Isolation and identification of peptides from soy 11S-globulin with hypocholesterolemic activity. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 41, n. 6, p. 710–714, 2005.

PANYAM, D.; KILARA, A. Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification. **Trends in Food Science & Technology**, v. 7, n. 4, p. 120–125, 1996.

PAPALAMPROU, E. M.; DOXASTAKIS, G. I.; BILIADERIS, C. G.; KIOSSEOGLOU, V. Influence of preparation methods on physicochemical and gelation properties of chickpea protein isolates. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 2, p. 337–343, 2009.

PAREDES-LOPEZ, O. **Safflower proteins for food use. In Development in Food Proteins**,

7 ed.; Hudson, B. J. F., Ed. Elsevier S ed. [s.l: s.n.], 1991.

PATEL, P. D.; FRY, J. C. The search for standardized methods for assessing protein functionality. **Journal of Food Protection**, v. 5, p. 299–333, 1987.

PEDROCHE, J.; YUST, M. M.; GIRÓN-CALLE, J.; ALAIZ, M.; MILLÁN, F.; VIOQUE, J. Utilisation of chickpea protein isolates for production of peptides with angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 82, n. 9, p. 960–965, 2002.

PEÑA-CASTILLO, L.; HUGHES, T. R. Why are there still over 1000 uncharacterized yeast genes? **Genetics**, v. 176, p. 7–14, 2007.

PERKINS, W. D. Fourier Transform-Infrared Spectroscopy – Instrumentation. **Journal Chemometrics.**, p. A5–A10, 1986.

PHONGTHAI, S.; D’AMICO, S.; SCHOENLECHNER, R.; HOMTHAWORNCHOO, W.; RAWDKUEN, S. Fractionation and antioxidant properties of rice bran protein hydrolysates stimulated by in vitro gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, v. 240, p. 156–164, 2018.

PIHLANTO, A.; AKKANEN, S.; KORHONEN, H. J. ACE-inhibitory and antioxidant properties of potato (*Solanum tuberosum*). **Food Chemistry**, v. 109, n. 1, p. 104–112, 2008.

POLÔNIO, M. L. T.; PERES, F. Consumo de aditivos alimentares e efeitos à saúde: desafios para a saúde pública brasileira. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 25, n. 8, p. 1653–1666, 2009.

POMERANZ, Y. **Functional Properties of Food Components**. Academic P ed. Londres: [s.n.], 1991.

POTTER, S. M. Potter. soy protein and cardiovascular disease the impact of bioactive components in soy. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 8, p. 231–235, 1998.

PRINGLE, J. R.; HARTWELL, L. H. The *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. In: STRATHERN, J. N.; JONES, E. .; BROACH, J. R. (Eds.). **Cold Spring Harbor, NY**. [s.l: s.n.]. p. 97–142, 1982.

PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 8, p. 3396–3402, 2000.

QUAGLIA, G. B.; ORBAN, E. Influence of the degree of hydrolysis on the solubility of the protein hydrolysates from sardine (*Sardina pilchardus*). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 38, n. 3, p. 271–276, 1987.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. **Medicina Veterinária e Doenças Infecciosas**. 1ª ed., Porto Alegre: ARTMED, 2007.

RABELLO-GAY, M. N.; RODRIGUES, M. A. R MONTELEONE-NETO, R. Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese: métodos e critérios de avaliação. **Revista Brasileira de Genética**, 1991.

- RAGAB, D. D. M.; BABIKER, E. E.; ELTINAY, A. H. Fractionation, solubility and functional properties of cowpea (*Vigna unguiculata*) proteins as affected by pH and/or salt concentration. **Food Chemistry**, v. 84, n. 2, p. 207–212, 2004.
- RAI, M.; PARALIKAR, P.; JOGEE, P.; AGARKAR, G.; INGLE, A. P.; DERITA, M.; ZACCHINO, S. Synergistic antimicrobial potential of essential oils in combination with nanoparticles: Emerging trends and future perspectives. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 519, n. 1–2, p. 67–78, 2017.
- 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 and Medicine**, v. 26, n. 9, p. 1231–1237, 1999.
- REYES-CAUDILLO, E.; TECANTE, A.; VALDIVIA-LÓPEZ, M. A. Dietary fibre content and antioxidant activity of phenolic compounds present in Mexican chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. **Food Chemistry**, v. 107, n. 2, p. 656–663, 2008.
- RIVERA, L. E. C.; RAMOS, A. P.; DESGARENNES, C. P. Artículo de revisión Péptidos antimicrobianos: antibióticos naturales de la piel. **Dermatología Revista Mexicana**, v. 51, p. 57–67, 2007.
- ROEHRS, R.; FREITAS, D. R. J.; MASUDA, A.; HENRIQUES, J. A. P.; GUECHEVA, T. N.; RAMOS, A. L. L. P.; SAFFI, J. Effect of vitamin A treatment on superoxide dismutase-deficient yeast strains. **Archives of Microbiology**, v. 192, n. 3, p. 221–228, 2010.
- RUFINO, M. S. M. D. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S. DE; MORAIS, S. M. DE; SAMPAIO, C. G. D. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-COLIXTO, F. D.; SAURA-CALIXTO, F. D.; SAURA-COLIXTO, F. D. Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **Comunicado Técnico on line**, v. 127, p. 1–3, 2007.
- SAADI, S.; SAARI, N.; ANWAR, F.; ABDUL HAMID, A.; GHAZALI, H. M. Recent advances in food biopeptides: Production, biological functionalities and therapeutic applications. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 1, p. 80–116, 2015.
- SAIGA, A.; TANABE, S.; NISHIMURA, T. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 3661–3667, 2003.
- SAKAMOTO, H.; KUMAZAWA, Y.; MOTOKI, M. Strength of protein gels prepared with microbial transglutaminase as related to reaction conditions. **Journal of Food Science**, v. 59, n. 4, 1994.
- SALAMI, M.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A.; EHSANI, M. R.; YOUSEFI, R.; HAERTLÉ, T.; CHOBERT, J. M.; RAZAVI, S. H.; HENRICH, R.; BALALAIE, S.; EBADI, S. A.; POURTAKDOOST, S.; NIASARI-NASLAJI, A. Improvement of the antimicrobial and antioxidant activities of camel and bovine whey proteins by limited proteolysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 6, p. 3297–3302, 2010.
- SALAZAR-VEGA, I. M.; SEGURA-CAMPOS, M. R.; CHEL-GUERRERO, L. A;

BETANCUR-ANCONA, D. A. Antihypertensive and antioxidant effects of functional foods containing chia (*Salvia hispanica*) protein hydrolysates. **Scientific, Health and Social Aspects of the Food Industry**, p. 381–398, 2010.

SANDOVAL-OLIVEROS, M. R.; PAREDES-LÓPEZ, O. Isolation and characterization of proteins from chia seeds (*Salvia hispanica* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 1, p. 193–201, 2013.

SANTOS, R. D. III diretrizes brasileiras sobre dislipidemias e diretriz de prevenção da aterosclerose do departamento de aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 77, p. 4-48, 2001. Suplemento III.

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

SATHE, S. K.; DESHPANDE, S.; SALUNKHE, D. K. Functional properties of lupin seed (*Lupinus mutam*) proteins and protein concentrates. **Journal of Food Science**, v. 47, p. 491–497, 1982.

SATHE, S. K.; HAMAKER, B. R.; SZE-TAO, K. W. C.; VENKATACHALAM, M. Isolation, purification, and biochemical characterization of a novel water soluble protein from Inca peanut (*Plukenetia volubilis* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 17, p. 4906–4908, 2002.

SEGURA-CAMPOS, M.; ACOSTA-CHI, Z.; ROSADO-RUBIO, G.; CHEL-GUERRERO, L.; BETANCUR-ANCONA, D. Whole and crushed nutlets of chia (*Salvia hispanica*) from Mexico as a source of functional gums. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 34, n. 4, p. 701–709, 2014a.

SEGURA-CAMPOS, M. R.; CIAU-SOLÍS, N.; ROSADO-RUBIO, G.; CHEL-GUERRERO, L.; BETANCUR-ANCONA, D. Chemical and functional properties of chia seed (*Salvia hispanica* L.) gum. **International Journal of Food Science**, v. 2014, 2014b.

SEGURA-CAMPOS, M. R.; SALAZAR-VEGA, I. M.; CHEL-GUERRERO, L. A.; BETANCUR-ANCONA, D. A. Biological potential of chia (*Salvia hispanica* L.) protein hydrolysates and their incorporation into functional foods. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, n. 2, p. 723–731, 2013.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações**. São Paulo: Editora-Livraria Varela: [s.n.], 1996.

SHEWRY, P. R.; HALFORD, N. G.; ASHTON, L.; BS, B. Cereal seed storage proteins : structures, properties and role in grain utilization. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 370, p. 947–958, 2002.

SHI, Y.; KOVACS-NOLAN, J.; JIANG, B.; TSAO, R.; MINE, Y. Antioxidant activity of enzymatic hydrolysates from eggshell membrane proteins and its protective capacity in human intestinal epithelial Caco-2 cells. **Journal of Functional Foods**, v. 10, p. 35–45, 2014.

SIERRA, L.; ROCO, J.; ALARCON, G.; MEDINA, M.; VAN NIEUWENHOVE, C.;

PERAL DE BRUNO, M.; JEREZ, S. Dietary intervention with *Salvia hispanica* (chia) oil improves vascular function in rabbits under hypercholesterolaemic conditions. **Journal of Functional Foods**, v. 14, p. 641–649, 2015.

SIGMA. **Enzymatic Assay of protease**. Sigma Quality Control Test Procedure. 1999.

SILA, A.; NEDJAR-ARROUME, N.; HEDHILI, K.; CHATAIGNÉ, G.; BALTI, R.; NASRI, M.; DHULSTER, P.; BOUGATEF, A. Antibacterial peptides from barbel muscle protein hydrolysates: Activity against some pathogenic bacteria. **LWT - Food Science and Technology**, v. 55, n. 1, p. 183–188, 2014.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v. 22, n. 1, p. 94–103, 1999.

SILVA, F. G. D. E.; HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; AMIGO, L.; NETTO, F. M.; MIRALLES, B. Identification of peptides released from flaxseed (*Linum usitatissimum*) protein by Alcalase® hydrolysis: Antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 76, p. 140–146, 2017.

SINGH, N.; MAKHARIA, G. K.; JOSHI, Y. K. Dietary survey and total dietary fiber intake in patients with irritable bowel syndrome attending a tertiary referral hospital. **Indian journal of gastroenterology : official journal of the Indian Society of Gastroenterology**, v. 27, n. 2, p. 66–70, 2008.

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.

SOARES, R. A. M.; MENDONÇA, S.; DE CASTRO, L. Í. A.; MENEZES, A. C. C. C. C.; ARÊAS, J. A. G. Major peptides from Amaranth (*Amaranthus cruentus*) protein inhibit HMG-CoA reductase activity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 2, p. 4150–4160, 2015.

SOUSA, C. M. D. M.; SILVA, H. R. E.; VIEIRA, G. M.; AYRES, M. C. C.; DA COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. D. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351–355, 2007.

SPADY, D. K.; DIETSCHY, J. M. Dietary saturated triacylglycerols suppress hepatic low density lipoprotein receptor activity in the hamster. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 82, n. 13, p. 4526–30, 1985.

SPELLMAN, D.; MCEVOY, E.; O'CUINN, G.; FITZGERALD, R. J. Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis. **International Dairy Journal**, v. 13, n. 6, p. 447–453, 2003.

SRINIVASAN, C.; LIBA, A.; IMLAY, J. A.; VALENTINE, J. S.; GRALLA, E. B. Yeast

lacking superoxide dismutase(s) show elevated levels of “free iron” as measured by whole cell electron paramagnetic resonance. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 38, p. 29187–29192, 2000.

STINCO, C. M.; BARONI, M. V.; DI PAOLA NARANJO, R. D.; WUNDERLIN, D. A.; HEREDIA, F. J.; MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A. J.; VICARIO, I. M. Hydrophilic antioxidant compounds in orange juice from different fruit cultivars: Composition and antioxidant activity evaluated by chemical and cellular based (*Saccharomyces cerevisiae*) assays. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 37, p. 1–10, 2015.

STIPANUK, M. **Bioquimical and physiological aspects of human nutrition**. W.B. Saund ed. [s.l: s.n.], 2000.

STONE, A. K.; KARALASH, A.; TYLER, R. T.; WARKENTIN, T. D.; NICKERSON, M. T. Functional attributes of pea protein isolates prepared using different extraction methods and cultivars. **Food Research International**, v. 76, n. P1, p. 31–38, 2015.

SUN, Y.; CHANG, R.; LI, Q.; LI, B. Isolation and characterization of an antibacterial peptide from protein hydrolysates of *Spirulina platensis*. **European Food Research and Technology**, v. 242, n. 5, p. 685–692, 2016.

TAGA, M. S.; MILLER, E. E.; PRATT, D. E. Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 61, n. 5, p. 928–931, 1984.

TANG, C.-H.; MA, C.-Y. Effect of high pressure treatment on aggregation and structural properties of soy protein isolate. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, n. 2, p. 606–611, 2009.

TAVANO, O. L. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 90, p. 1–11, 2013.

TIMILSENA, Y. P.; ADHIKARI, R.; BARROW, C. J.; ADHIKARI, B. Physicochemical and functional properties of protein isolate produced from Australian chia seeds. **Food Chemistry**, v. 212, p. 648–656, 2016a.

TIMILSENA, Y. P.; ADHIKARI, R.; BARROW, C. J.; ADHIKARI, B. Microencapsulation of chia seed oil using chia seed protein isolate-chia seed gum complex coacervates. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 91, p. 347–357, 2016b.

TIMILSENA, Y. P.; ADHIKARI, R.; BARROW, C. J.; ADHIKARI, B. Digestion behaviour of chia seed oil encapsulated in chia seed protein-gum complex coacervates. **Food Hydrocolloids**, v. 66, p. 71–81, 2017.

TIMILSENA, Y. P.; WANG, B.; ADHIKARI, R.; ADHIKARI, B. Preparation and characterization of chia seed protein isolate–chia seed gum complex coacervates. **Food Hydrocolloids**, v. 52, p. 554–563, jan. 2016c.

TIRGAR, M.; SILCOCK, P.; CARNE, A.; BIRCH, E. J. Effect of extraction method on functional properties of flaxseed protein concentrates. **Food Chemistry**, v. 215, p. 417–424, 2017.

TRAVKOVA, O. G.; MOEHWALD, H.; BREZESINSKI, G. The interaction of antimicrobial peptides with membranes. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 247, p. 521-532, 2017.

UNESP. **Espectroscopia de Absorção no Infravermelho (IRS)**. Disponível em: <<http://www2.sorocaba.unesp.br/gpm/ftir.htm>>. Acesso em: 19 dez. 2017.

URREA-VICTORIA, V.; PIRES, J.; TORRES, P. B.; SANTOS, D. Y. A. C. DOS; CHOW, F. Ensaio antioxidante em microplaca do poder de redução do ferro (FRAP) para extratos de algas. **Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo**, p. 1–6, 2016.

VALGAS, C.; MACHADO DE SOUZA, S.; A SMÂNIA, E. F.; SMÂNIA JR, A. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 369–380, 2007.

VAVRUSOVA, M.; PINDSTRUP, H.; JOHANSEN, L. B.; ANDERSEN, M. L.; ANDERSEN, H. J.; SKIBSTED, L. H. Characterisation of a whey protein hydrolysate as antioxidant. **International Dairy Journal**, v. 47, p. 86–93, 2015.

VÁZQUEZ-OVANDO, A.; BETANCUR-ANCONA, D.; CHEL-GUERRERO, L. Physicochemical and functional properties of a protein-rich fraction produced by dry fractionation of chia seeds (*Salvia hispanica* L.). **CyTA - Journal of Food**, v. 11, n. 1, p. 75–80, 2013.

VÁZQUEZ-OVANDO, J. A.; ROSADO-RUBIO, J. G.; CHEL-GUERRERO, L. A.; BETANCUR-ANCONA, D. A. Dry processing of chia (*Salvia hispanica* L.) flour: chemical characterization of fiber and protein. **CyTA - Journal of Food**, v. 8, n. 2, p. 117–127, 2010.

VÁZQUEZ OVANDO, A.; ROSADO RUBIO, G.; CHEL GUERRERO, L.; BETANCUR ANCONA, D. Physicochemical properties of a fibrous fraction from chia (*Salvia hispanica* L.). **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, n. 1, p. 168–173, 2009.

VIOQUE, J.; CLEMENTE, A.; PEDROCHE, J.; DEL, M.; YUST, M.; MILLÁN, F. Obtención y aplicaciones de hidrolizados protéicos. **Grasas y Aceites**, v. 52, n. January, p. 132–136, 2001.

VOJDANI, F. Solubility. In: HALL, G. M. (Ed.). **Methods of Testing Protein Functionality**. London: Chapman & Hall: [s.n.]. p. 265, 1996.

WAKASA, Y.; TAMAKOSHI, C.; OHNO, T.; HIROSE, S.; GOTO, T.; NAGAOKA, S.; TAKAIWA, F. The hypocholesterolemic activity of transgenic rice seed accumulating lactostatin, a bioactive peptide derived from bovine milk β -lactoglobulin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 8, p. 3845–3850, 2011.

WALD, M.; SCHWARZ, K.; REHBEIN, H.; BUSSMAN, B.; BEERMANN, C. Detection of antibacterial activity of an enzymatic hydrolysate generated by processing rainbow trout by-products with trout pepsin. **Food Chemistry**, v. 205, p. 221–228, 2016.

WANG, J. C.; KINSELLA, J. E. Functional properties of novel proteins: Alfalfa leaf protein were reduced following acetone extraction. **Journal of Food Science**, v. 41, n. 40, 1981.

WANG, J. S.; ZHAO, M. M.; ZHAO, Q. Z.; JIANG, Y. M.. Antioxidant properties of papain hydrolysates of wheat gluten in different oxidation systems. **Food Chemistry**, v. 101, n. 4, p. 1658–1663, 2007.

WANI, I. A.; SOGI, D. S.; SHIVHARE, U. S.; GILL, B. S. Physico-chemical and functional properties of native and hydrolyzed kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein isolates. **Food Research International**, v. 76, n. 1, p. 11-18, 2015.

WANYO, P.; CHOMNAWANG, C.; SIRIAMORNPUN, S. Substitution of wheat flour with rice flour and rice bran in flake products: Effects on chemical, physical and antioxidant properties. **World Applied Sciences Journal**, v. 7, n. 1, p. 49–56, 2009.

WEBER, C. W.; GENTRY, H. S.; KOHLHEPP, E. A.; MCCROHAN, P. R. The nutritional and chemical evaluation of chia seeds. **Ecology of Food and Nutrition**, v. 26, n. 2, p. 119–125, 1991.

WILDING, P. Functional properties of proteins in foods. **Journal of Chemical**, n. April, p. 182–189, 1984.

WILMSEN, P. K.; SANTA SPADA, D.; SALVADOR, M. Antioxidant activity of the flavonoid hesperedin in chemical and biological system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4757–4761, 2005.

WOLLINGER, A.; PERRIN, É.; CHAHBOUN, J.; JEANNOT, V.; TOURAUD, D.; KUNZ, W. Antioxidant activity of hydro distillation water residues from *Rosmarinus officinalis* L. leaves determined by DPPH assays. **Comptes Rendus Chimie**, v. 19, n. 6, p. 754–765, 2016.

World Heart Federation – WHT. Disponível em: <<https://www.world-heart-federation.org/>>. Acesso em: 19 jan. 2018.

WUNDERLICH, B. **Thermal Characterization of Polymeric Materials**. 2^a ed, Edi ed. Califórnia USA: [s.n.]. v. 1

XIAO, P.; HUANG, H.; CHEN, Y.; CHEN, J.; LI, X.; SHI, H. Nutritional evaluation, characterization and antioxidant activity of radix isatidis protein hydrolysates under simulated gastrointestinal digestion. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 2, n. 11, p. 831–838, 2014.

YAN, Q. J.; HUANG, L. H.; SUN, Q.; JIANG, Z. Q.; WU, X. Isolation, identification and synthesis of four novel antioxidant peptides from rice residue protein hydrolyzed by multiple proteases. **Food Chemistry**, v. 179, p. 290–295, 2015.

YANG, J. I.; HO, H. Y.; CHU, Y. J.; CHOW, C. J. Characteristic and antioxidant activity of retorted gelatin hydrolysates from cobia (*Rachycentron canadum*) skin. **Food Chemistry**, v. 110, n. 1, p. 128–136, 2008.

YANG, L.; CHEN, J. H.; XU, T.; NIE, M. H.; YANG, H. K. Hypocholesterolemic effect of rice protein is due to regulating hepatic cholesterol metabolism in adult rats. **Gene**, v. 512, n. 2, p. 470–476, 2013.

YASUMATSU, K.; SAWADA, K.; MORITAKA, S.; MISAKI, M.; TODA, J.; WADA, T.; ISHII, K. Utilization of soybean products in fish paste products. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 36, n. 5, p. 719-727, 1972.

YIN, H.; PU, J.; WAN, Y.; XIANG, B.; BECHTEL, P. J.; SATHIVEL, S. Rheological and functional properties of catfish skin protein hydrolysates. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 1, p. 11–17, 2010.

YOKOTA, S.; FUJII, N. Contributions of the lipopolysaccharide outer core oligosaccharide region on the cell surface properties of *Pseudomonas aeruginosa*. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v. 30, p. 97–109, 2007.

YOON, Y.; YOON, J.; JANG, M. Y.; NA, Y.; KO, Y.; CHOI, J. H.; SEOK, S. H. High Cholesterol Diet Induces IL-1?? Expression in adult but not larval zebrafish. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, p. 2–9, 2013.

YULIANA, M.; TRUONG, C. T.; HUYNH, L. H.; HO, Q. P.; JU, Y. H. Isolation and characterization of protein isolated from defatted cashew nut shell: Influence of pH and NaCl on solubility and functional properties. **LWT - Food Science and Technology**, v. 55, n. 2, p. 621–626, 2014.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides in health and disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 15, p. 1199–1200, 2002.

ZHANG, M.; MU, T.-H. Identification and characterization of antioxidant peptides from sweet potato protein hydrolysates by Alcalase under high hydrostatic pressure. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 43, n. August, p. 92–101, 2017.

ZHANG, M.; MU, T. H.; SUN, M. J. Purification and identification of antioxidant peptides from sweet potato protein hydrolysates by Alcalase. **Journal of Functional Foods**, v. 7, n. 1, p. 191–200, 2014.

ZHANG, R.; ECKERT, T.; LUTTEKE, T.; HANSTEIN, S.; SCHEIDIG, A.; M. J. J. BONVIN, A.; E. NIFANTIEV, N.; KOZAR, T.; SCHAUER, R.; ABDULAZIZ ENANI, M.; SIEBERT, H. Structure-Function Relationships of Antimicrobial Peptides and Proteins with Respect to Contact Molecules on Pathogen Surfaces. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 1, p. 89–98, 2016.

ZHAO, Q.; SELOMULYA, C.; XIONG, H.; CHEN, X. D.; RUAN, X.; WANG, S.; XIE, J.; PENG, H.; SUN, W.; ZHOU, Q. Comparison of functional and structural properties of native and industrial process-modified proteins from long-grain indica rice. **Journal of Cereal Science**, v. 56, n. 3, p. 568–575, 2012a.

ZHAO, Q.; XIONG, H.; SELOMULYA, C.; CHEN, X. D.; ZHONG, H.; WANG, S.; SUN, W.; ZHOU, Q. Enzymatic hydrolysis of rice dreg protein: Effects of enzyme type on the functional properties and antioxidant activities of recovered proteins. **Food Chemistry**, v. 134, n. 3, p. 1360–1367, 2012b.

ZHONG, F.; LIU, J.; MA, J.; SHOEMAKER, C. F. Preparation of hypocholesterol peptides from soy protein and their hypocholesterolemic effect in mice. **Food Research**

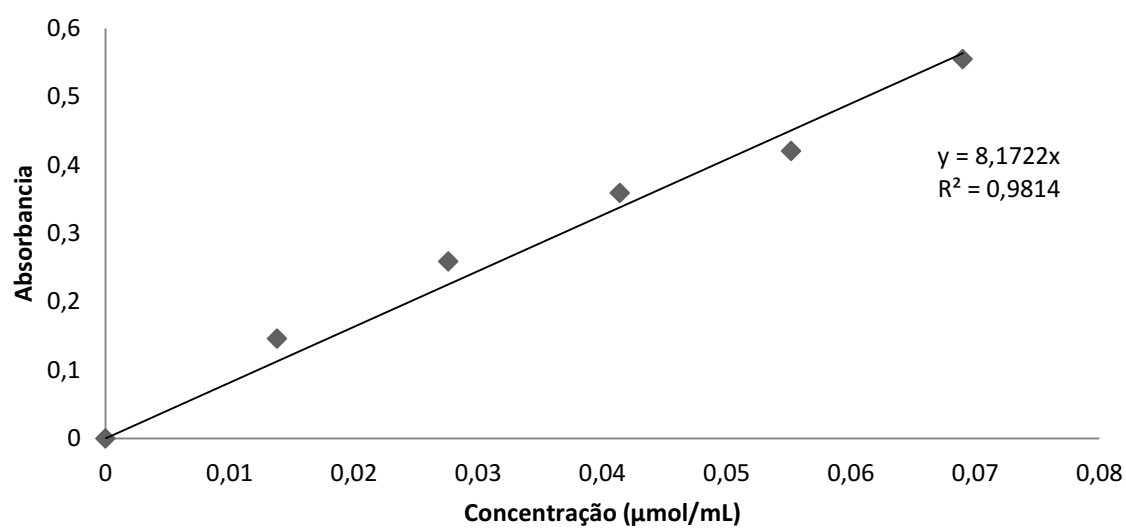
International, v. 40, n. 6, p. 661–667, 2007.

ZHOU, K.; SUN, S.; CANNING, C. Production and functional characterisation of antioxidative hydrolysates from corn protein via enzymatic hydrolysis and ultrafiltration. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1192–1197, 2012.

APÊNDICES

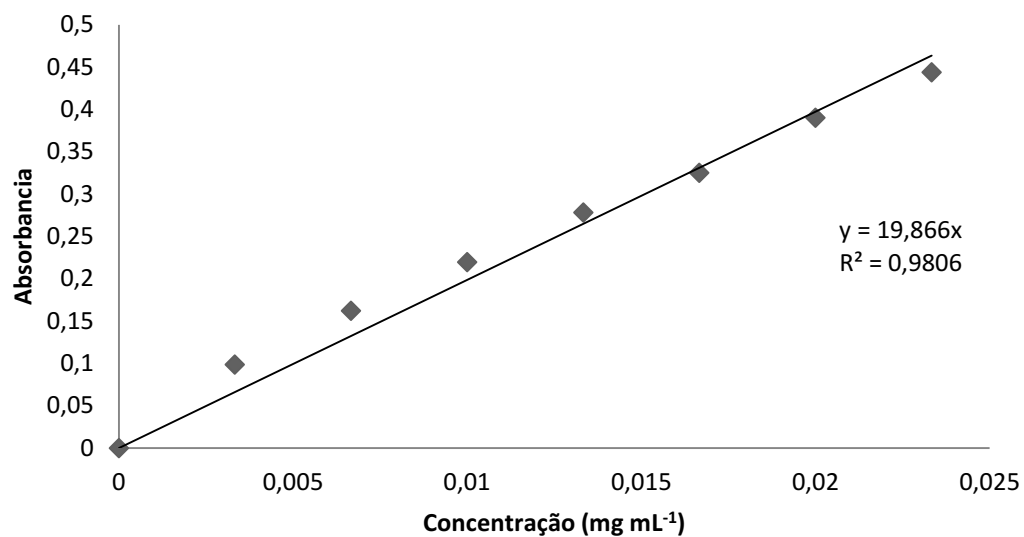
Apêndice 1

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



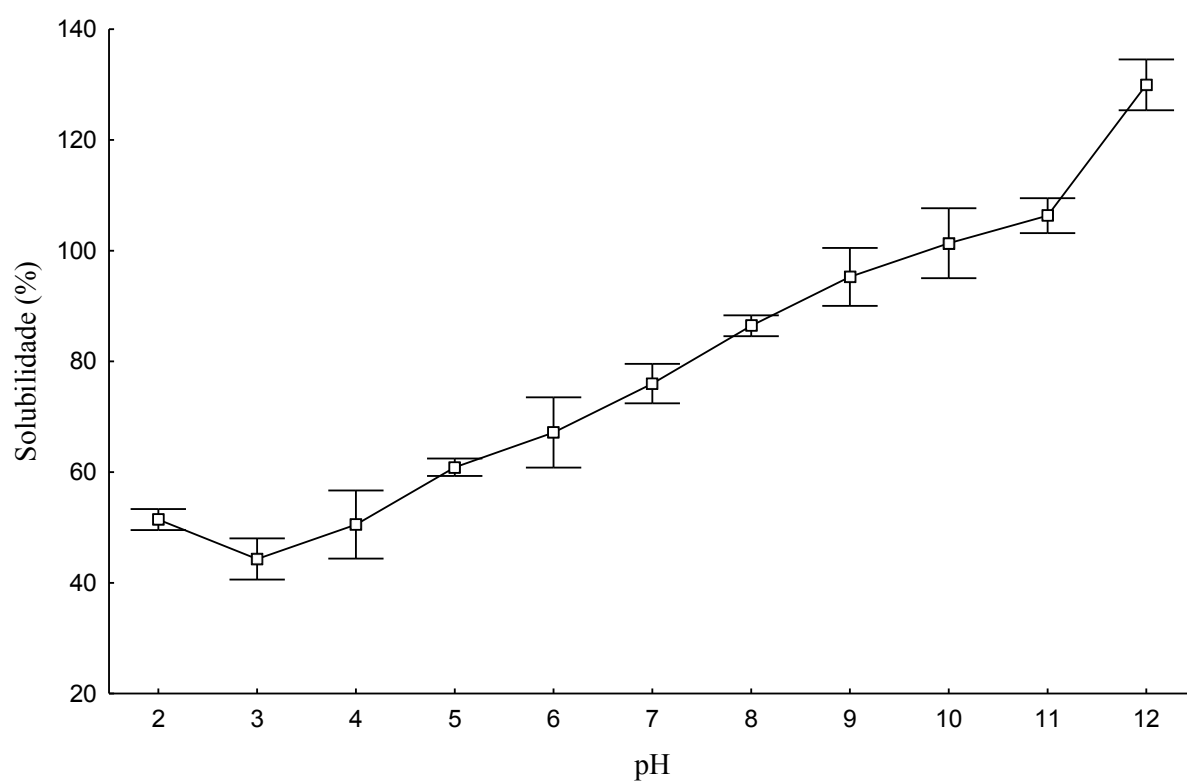
Apêndice 2

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



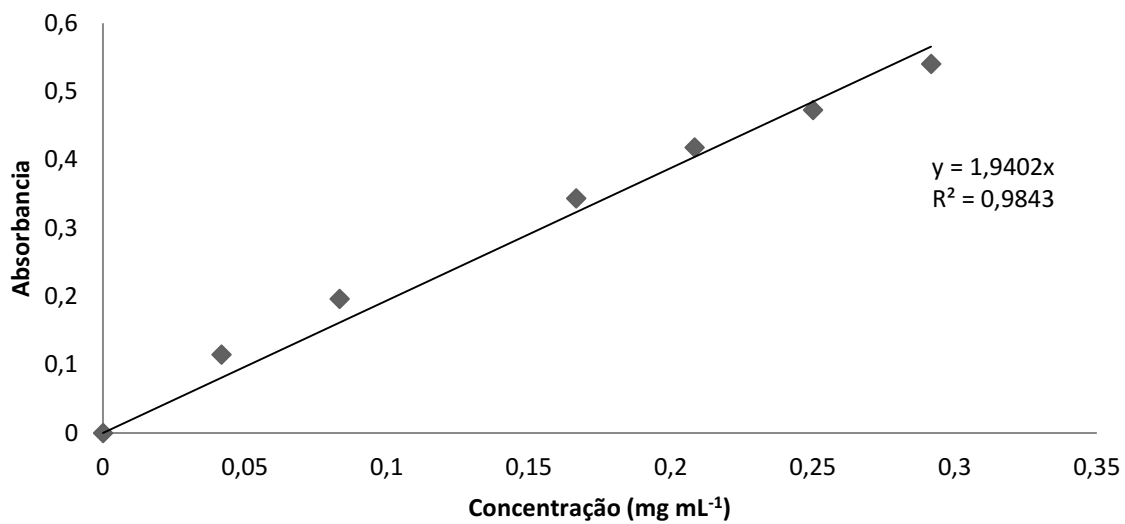
Apêndice 3

Curva de solubilidade para o subproduto (farinha de chia parcialmente desengordurada – CF).



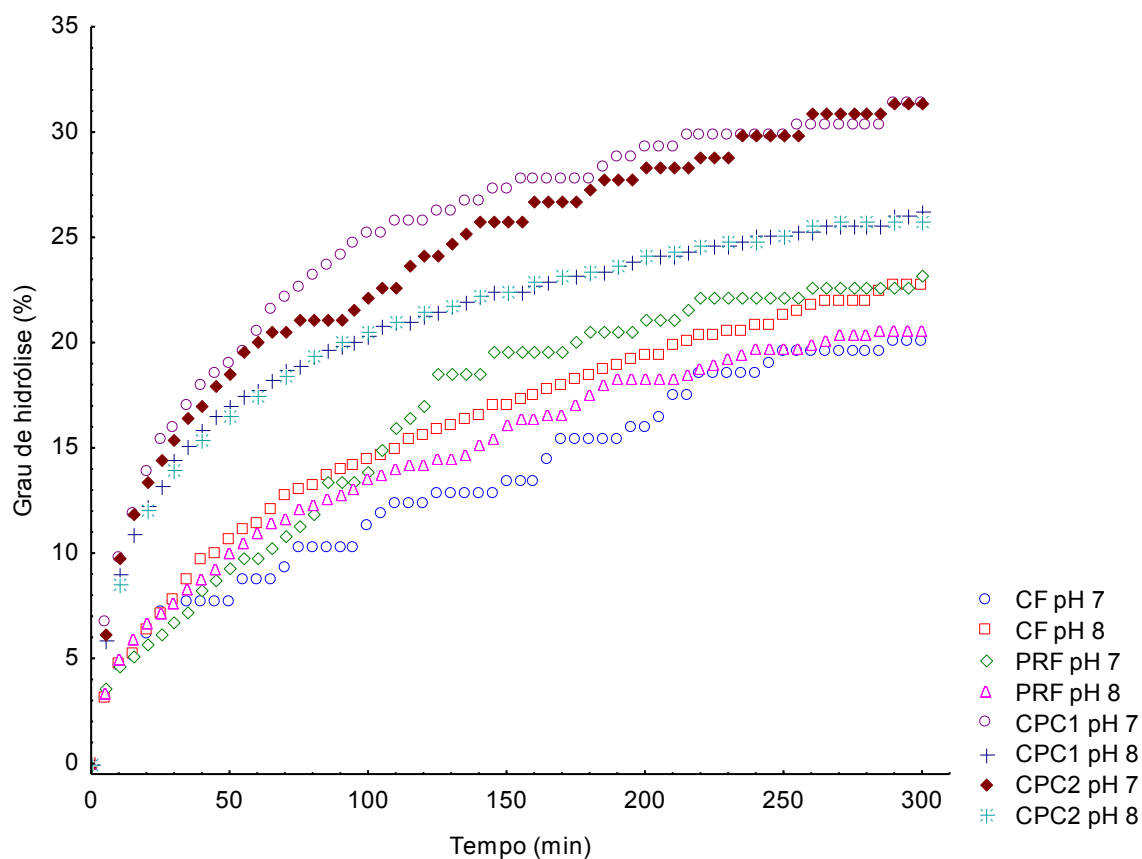
Apêndice 4

Curva padrão de albumina, utilizada para os cálculos do teor de proteína (LOWRY et al., 1951).



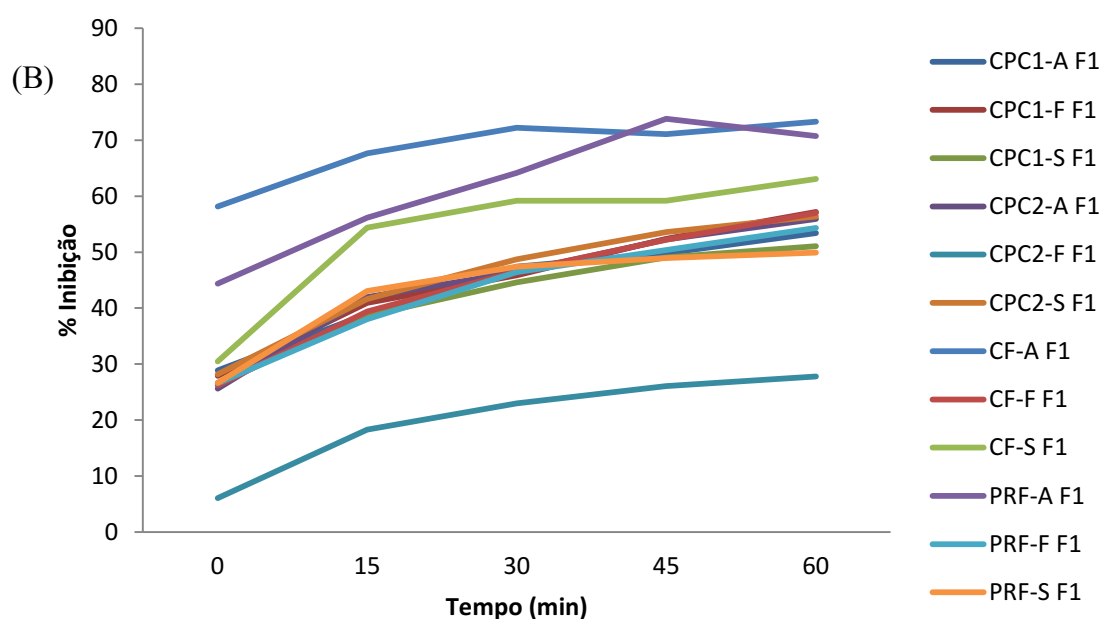
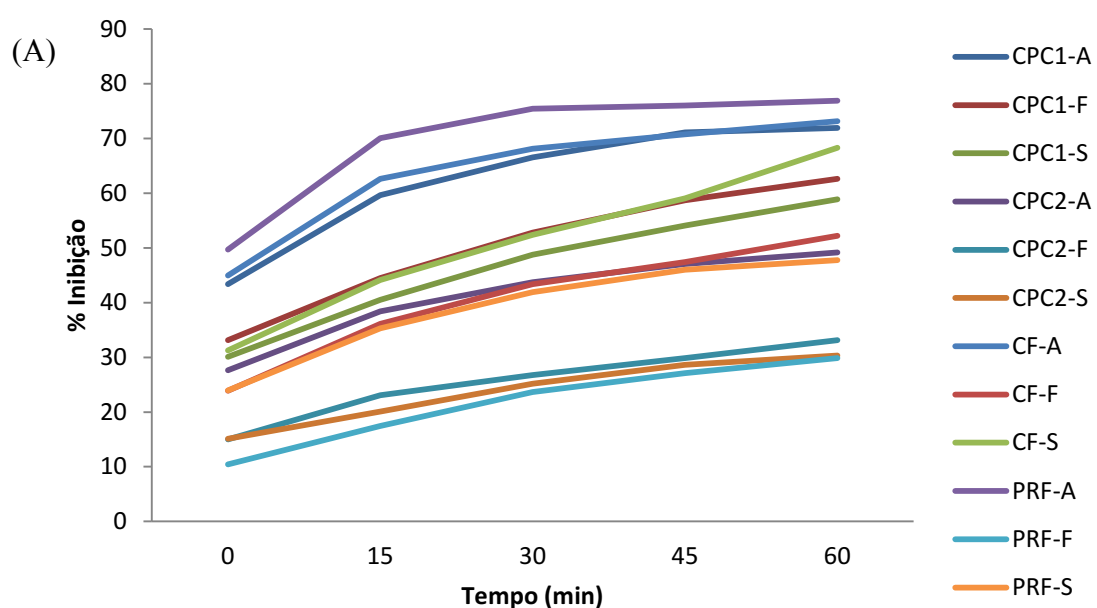
Apêndice 5

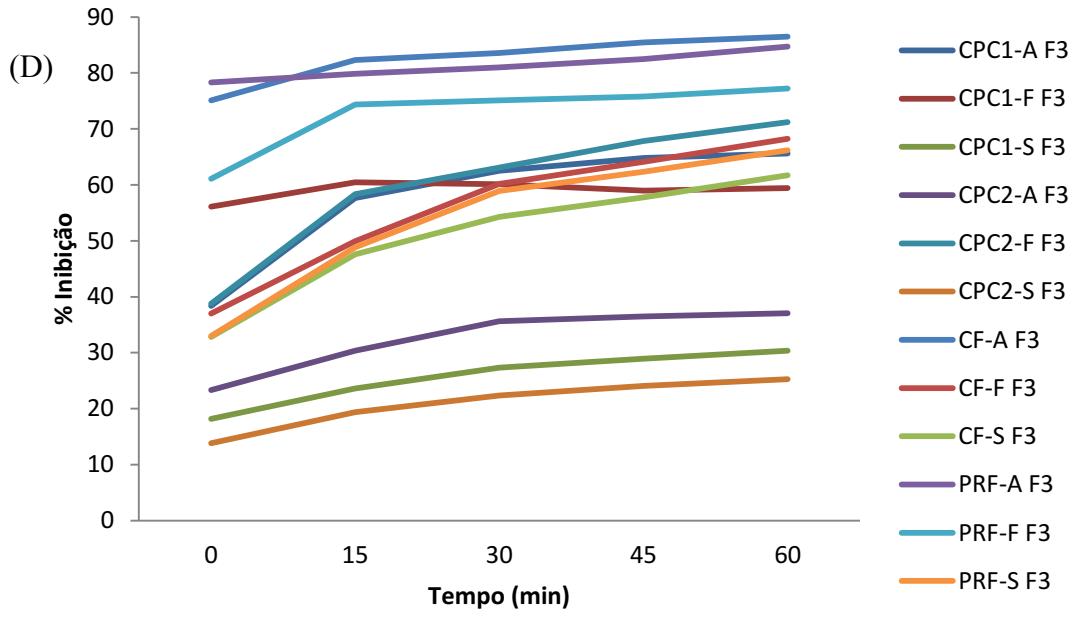
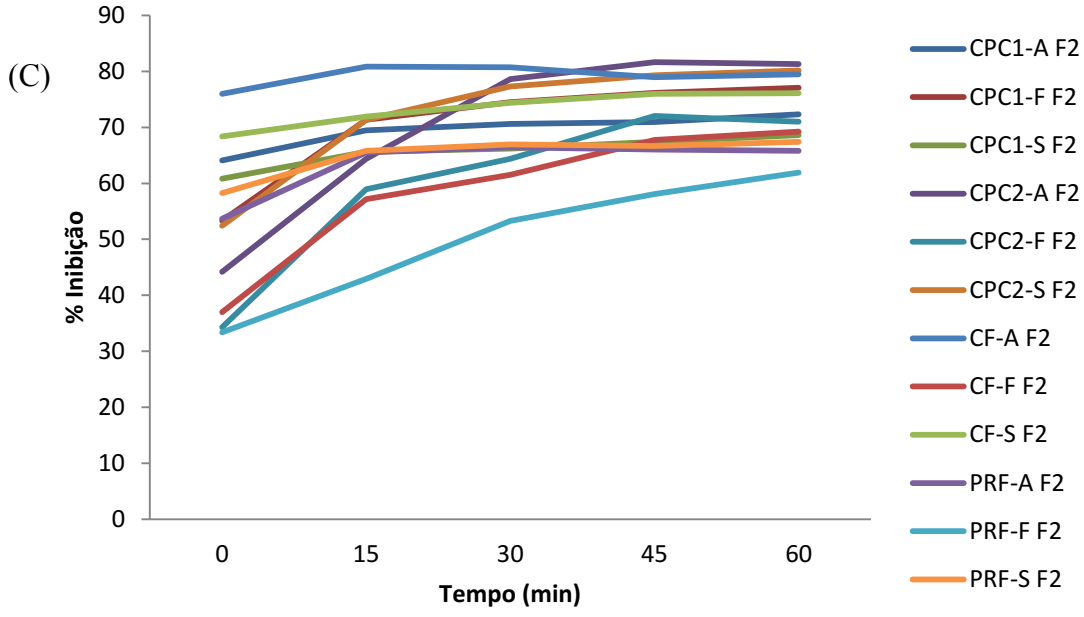
Estudo da condição de pH na obtenção de hidrolisado proteico de chia (*Salvia hispanica* L.) utilizando Alcalase. CF: farinha de chia parcialmente desengordurada – subproduto; PRF: hidrolisado da fração rica em proteína; CPC1: hidrolisado do concentrado proteico de chia 1; CPC2: hidrolisado do concentrado proteico de chia 2; A: Alcalase.



Apêndice 6

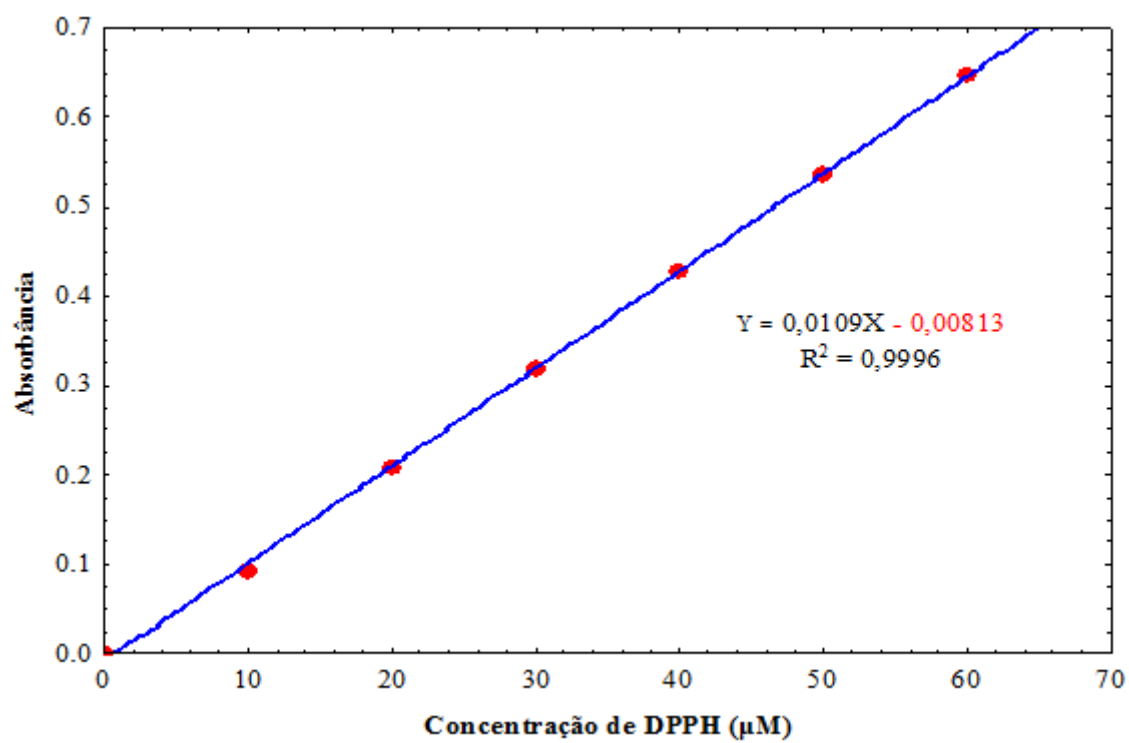
Resultados da reação de DPPH nos tempos 0, 15, 30, 45 e 60 min para os hidrolisados (A) e frações peptídicas de chia: F1, MM > 10 kDa (B), F2, MM 3-10 kDa (C) e F3, MM < 3 kDa (D) para a escolha do tempo de 45 min. de reação na concentração de 1 mg mL⁻¹ (melhor resultado dentre as diferentes concentrações estudadas). CPC1: hidrolisado de concentrado proteico de chia 1; CPC2: hidrolisado de concentrado proteico de chia 2; PRF: hidrolisado de fração rica em proteína; CF: hidrolisado de farinha de chia parcialmente desengordurada (subproduto), A: Alcalase, F: Flavourzyme; S: Sequencial Alcalase-Flavourzyme





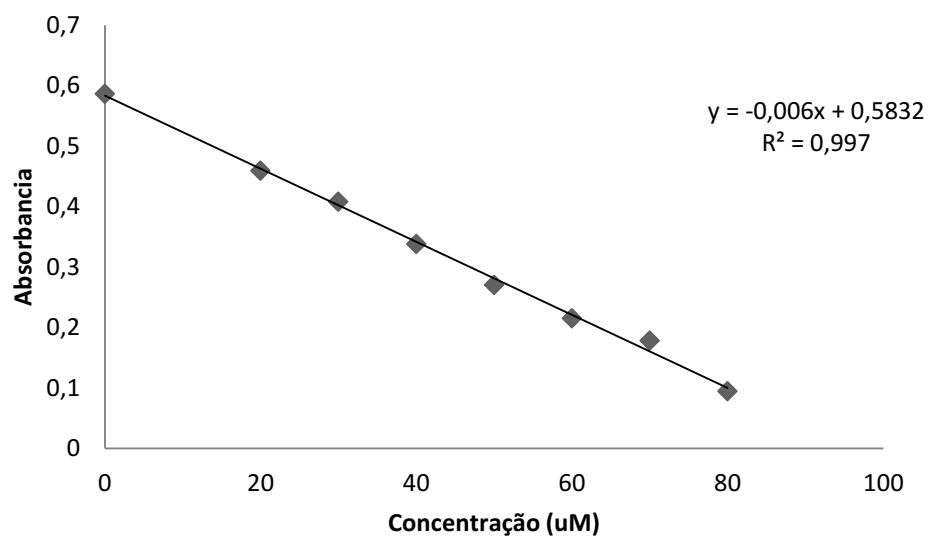
Apêndice 7

Curva padrão de DPPH para cálculo do EC50.



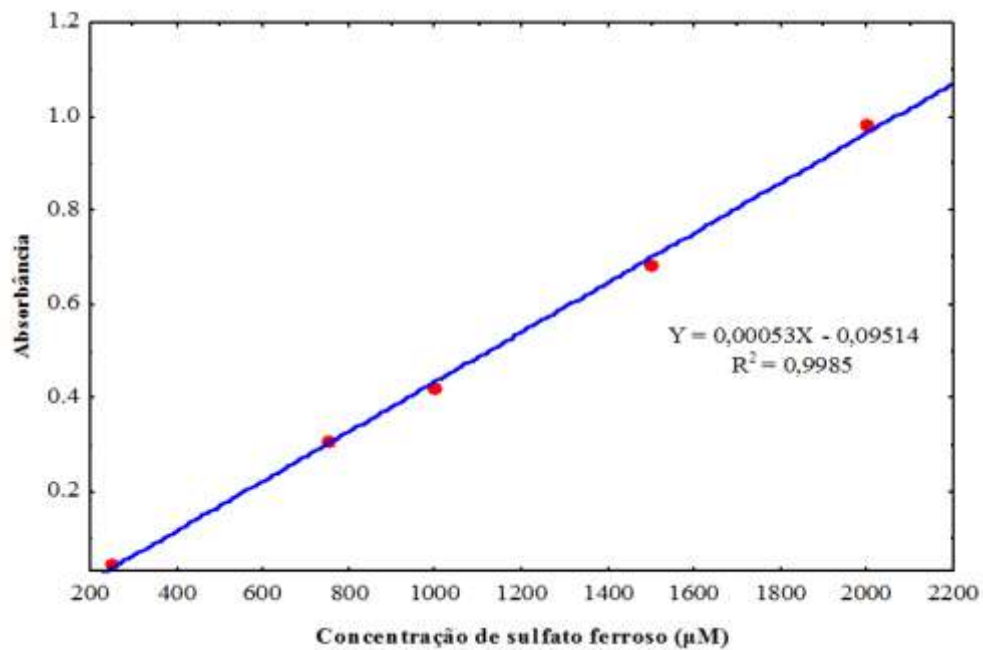
Apêndice 8

Curva padrão de Trolox para o cálculo de μM Trolox g^{-1} hidrolisado (método ABTS).



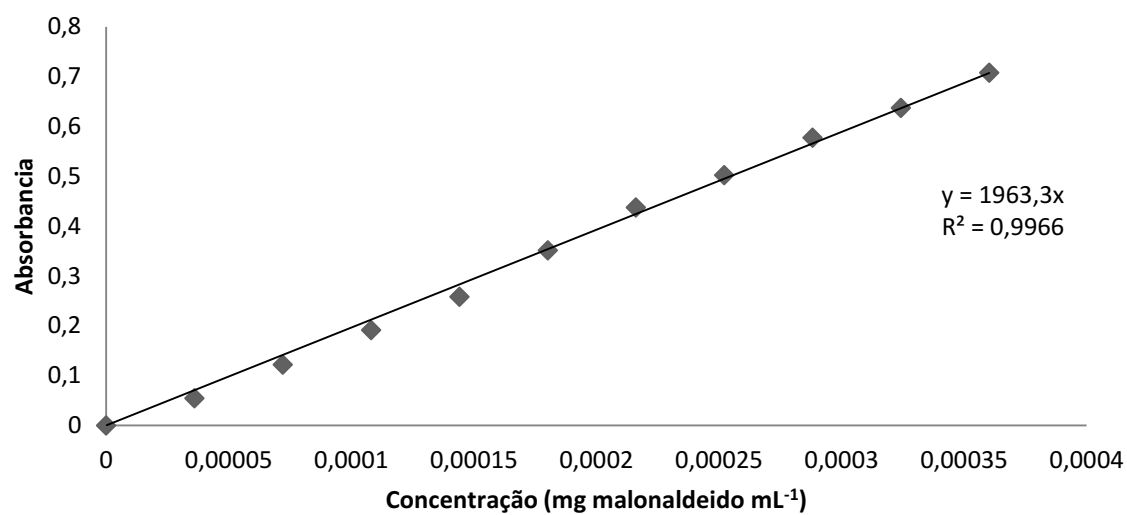
Apêndice 9

Curva padrão de sulfato ferroso para os cálculos de $\mu\text{mol FeSO}_4 \text{ g}^{-1}$ hidrolisado (FRAP).



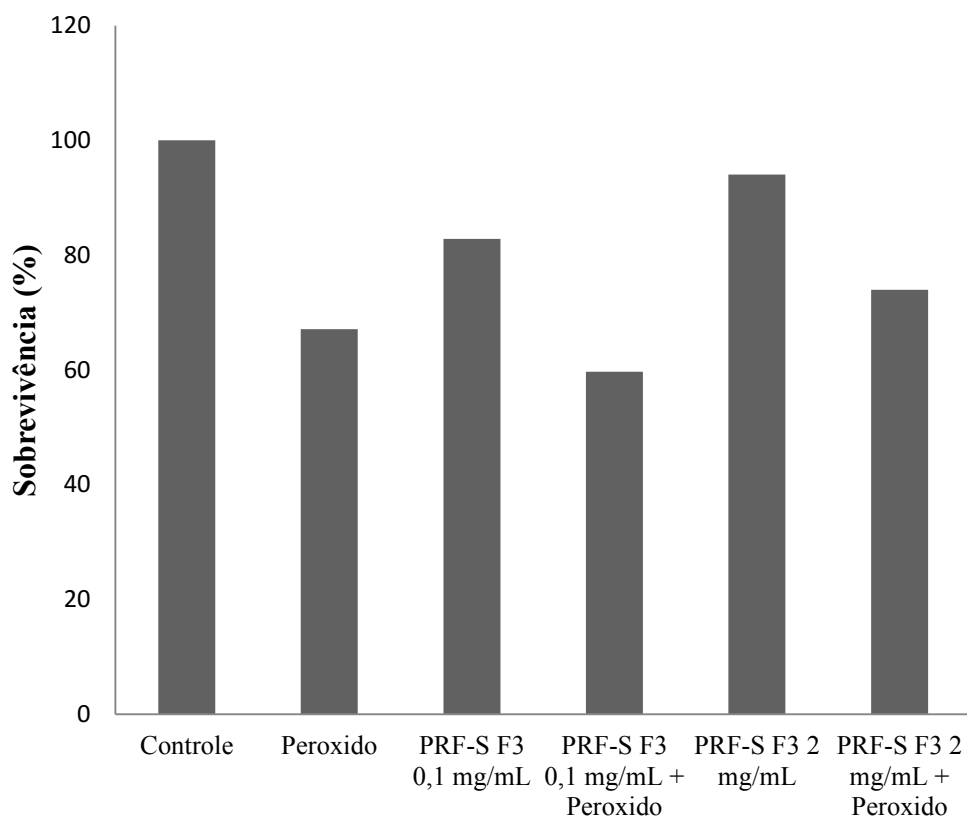
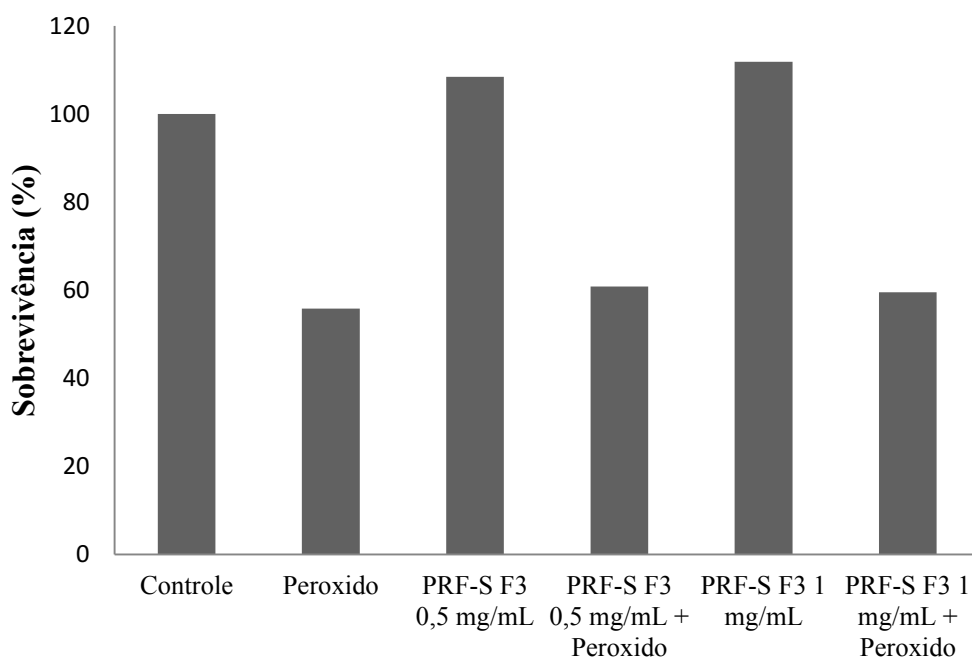
Apêndice 10

Curva padrão de malonaldeído (MDA) para o cálculo do mg de MDA por kg de carne determinado pelo ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).



Apêndice 11

Testes preliminares para determinação da dose ideal para as frações peptídicas ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$) em células de *Saccharomyces cerevisiae* submetidas ao estresse oxidativo induzido pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) para uma amostra (PRF-S F3: fração peptídica $< 3 \text{ kDa}$ de hidrolisado da fração rica em proteína pelo sistema sequencial).



Apêndice 12

Picos de espectros de infravermelho e atribuição para CF (farinha de chia parcialmente desengordurada, subproduto), PRF (fração rica em proteína), CPC1 (concentrado proteico 1) e CPC2 (concentrado proteico 2).

Propriedades	Número de onda do pico (cm ⁻¹)				Atribuições da região de pico
	CF	PRF	CPC1	CPC2	
-	3636,1	3615,6	3618,4	3657,3	N-H de alongamento assimétrico de Amida primária (monômero)
-	3520,3	3519,2	3595,2	3595,6	N-H ₂ amina alifática primária
Amida A	3321,7	3320,5	3319,4	3321,7	Principalmente alongamento de N-H das proteínas juntamente com ligação de hidrogênio
Amida B	3076,7	3075,6	3074,4	3076,7	Amida B: CH ₃ - estiramento assimétrico
-	2957,1	2957,9	2956,8	2957,1	Amida B: CH ₂ - estiramento assimétrico
-	2876,1	2876,9	2877,7	2876,1	CH ₃ - estiramento simétrico: principalmente proteínas
Amida I	1695,7	1698,4	1681,8	1688,0	C=O ligação de hidrogênio juntamente com COO ⁻
-	1659,0	1659,8	1660,6	1661,0	C=O ligação de hidrogênio juntamente com COO ⁻
Amida II	1551,0	1549,9	1550,7	1549,1	N-H dobra/C-N alongamento das proteínas
-	1446,9	1447,7	1446,5	1448,8	CH ₂ - flexão assimétrica: principalmente de lipídios
-	1400,6	1401,4	1402,1	1400,6	COO- estiramento simétrico
Amida III	1230,8	1233,6	1234,3	1230,8	N-H curva juntamente com estiramento C-N (<i>β-sheet</i> , proteína)
-	1165,3	1164,1	1164,9	1165,3	CO-O-C estiramento assimétrico: glicogênio e ácidos nucleicos
-	1082,3	1081,2	1080,0	1080,4	C-O estiramento
-	1032,2	1033,0	c	c	C-O alongamento/C-O dos carboidratos C-O-H
-	698,5	695,4	700,1	700,4	-CH=CH- estiramento
-	686,9	672,3	675,0	677,3	CH ₂ bandas, carboidratos, proteínas e lipídios (esteróis de ácidos graxos)

- nenhum nome comum para a região espectral.

c: sem pico.