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

OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS ENCAPSULADOS A PARTIR DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE CAMARÃO BRANCO (*Litopenaeus vannamei*)

JULIANA MACHADO LATORRES

CARLOS PRENTICE-HERNÁNDEZ

Orientador

RIO GRANDE, RS
2018

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

OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS ENCAPSULADOS A PARTIR DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE CAMARÃO BRANCO (*Litopenaeus vannamei*)

JULIANA MACHADO LATORRES

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

CARLOS PRENTICE-HERNÁNDEZ

Orientador

RIO GRANDE, RS
2018

Ficha catalográfica

L358o Latorres, Juliana Machado.
Obtenção de peptídeos bioativos encapsulados a partir da hidrólise enzimática de camarão branco (*Litopenaeus vannamei*) / Juliana Machado Latorres. – 2018.
193 p.

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

1. Crustáceo 2. Hidrolisados 3. Funcionalidade 4. Bioatividade 5. Ultrafiltração 6. Encapsulamento I. Prentice-Hernández, Carlos II. Título.

CDU 639.5

Catalogação na Fonte: Bibliotecário Me. João Paulo Borges da Silveira CRB 10/2130

APROVAÇÃO

Tese defendida por Juliana Machado Latorres aprovada em 26 de abril de 2018, pela Comissão Examinadora constituída pelos professores:

Prof. Dr. Carlos Prentice-Hernández – FURG

Profa. Dra. Elessandra da Rosa Zavareze - UFPel

Profa. Dra. Ana Paula de Souza Votto - FURG

Profa. Dra. Myriam de Las Mercedes Salas Mellado – FURG

Profa. Dra. Vilásia Guimarães Martins - FURG

Dedico esta conquista a minha amada e eterna avó Srª Geni Machado e ao meu fiel companheiro Luciano Machado Silveira.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado esperança, força, fé e consolo em todos os momentos que necessitei ao longo da minha vida.

Aos meus amados avós Geni *(In memoriam)* e Jader *(In memoriam)* pela minha criação. Em especial para minha avó, que mesmo após seu falecimento durante o último ano desse trabalho, continuou sendo a minha inspiração para concluir o trabalho.

Aos meus pais Marisa, Dorval e Alessandro agradeço pela vida que me proporcionaram, pela educação profissional e pelo incentivo constante.

Ao meu amor Luciano por toda paciência, amor, dedicação, companheirismo, cumplicidade e força recebida para seguir na minha profissão. Obrigada por tudo!

Aos meus irmãos Junior e Caroline pelo carinho, conforto e compreensão que dispuseram comigo.

À minha tia Keli pelo incentivo e por estar sempre torcendo pelo meu sucesso.

Ao Prof. Carlos por ter me acolhido durante esses anos e por todos os ensinamentos transmitidos.

À Profa. Myriam por todos os ensinamentos e carinho recebidos ao longo de toda a minha jornada acadêmica.

À pós-doutoranda Meritaine da Rocha por toda a dedicação, ensinamentos e disponibilidade para finalização desse trabalho.

Às minhas amigas Paola e Viviane pela amizade, pelo carinho, pelo incentivo, pelas ajudas técnicas e por serem verdadeiros anjos, que se mantiveram ao meu lado nas alegrias e principalmente durante minha maior tristeza. E que foram verdadeiras joias que Deus me deu, essa conquista também é de vocês.

À amiga Michele pelo companheirismo, cumplicidade e por ter se mantido presente durante muito tempo das 8h até as 23h. Pela amizade e pelo exemplo de dedicação e otimismo.

À minha amiga Sabrine pela amizade, companheirismo e disponibilidade diária para que essa tese fosse concluída.

À minha amiga Sibele pelo exemplo de dedicação e responsabilidade.

Aos meus amigos Cláudio e Daiane pelo carinho e amizade que sempre me ofertaram.

À minha amiga Taiana por toda ajuda e ensinamentos.

À Profa. Ana Voto pelos ensinamentos e espaço ofertado para realização das análises.

À doutoranda Aline Portantiolo pelos ensinamentos e disponibilidade para realização das análises *in vivo*.

Aos amigos que passaram pela minha caminhada no laboratório: Adriana, Alan, Camila, Daniela, Douglas, Inajara, Janise, Juan, Karina Lima, Karina Madruga e Taís agradeço por todos os momentos compartilhados.

Ao Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA) pela estrutura ofertada para realização desse trabalho.

À Estação Marinha de Aquicultura (EMA) e ao Prof. Dr. Wilson Wasielesky Junior pela doação da matéria-prima utilizada no trabalho.

À Profa. Dra. Eliana por todos os ensinamentos.

À Profa. Dra. Michele Greque de Morais pela disponibilidade de seus equipamentos.

Aos membros da banca examinadora, Profa. Dra. Ana Paula de Souza Votto, Profa. Dra. Elessandra da Rosa Zavareze, Profa. Dra. Myriam de las Mercedes Salas-Mellado e Profa. Dra. Vilásia Guimarães Martins.

À CAPES pela bolsa de estudos.

Agradeço a todos aqueles que contribuíram e me incentivaram para a realização deste trabalho.

E por fim, um agradecimento especial à Universidade Federal do Rio Grande (FURG) que me concedeu um ensino de elevada qualidade tanto na graduação como na pós-graduação, permitindo que eu me tornasse a profissional que sou hoje.

Não tente ser uma pessoa de sucesso. Em vez disso, seja uma pessoa de valor.

Albert Einstein

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO III – DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

ARTIGO I - Propriedades funcionais e antioxidantes de hidrolisados proteicos de camarão branco (*Litopenaeus vannamei*)
Tabela 1 – Composição aminoacídica dos hidrolisados proteicos de camarão branco, com diferentes GH, preparados com as enzimas Alcalase e a Protamex 74
Tabela 2 – Propriedades de espuma de hidrolisados proteicos de camarão com diferentes GH, preparados com as enzimas Alcalase e a Protamex..... 77
Tabela 3 – Propriedades emulsificantes de hidrolisados proteicos de camarão com diferentes GH, preparados com as enzimas Alcalase e a Protamex..... 77

ARTIGO II - Efeitos antimicrobiano e antitumoral apresentados por hidrolisados proteicos de camarão branco (*Litopenaeus vannamei*)
Tabela 1 – Composição aminoacídica dos hidrolisados proteicos de camarão branco produzidos com as enzimas Alcalase e Protamex para os GH de 10 e 20%..... 99
Tabela 2 – Atividade antimicrobiana dos hidrolisados proteicos de camarão branco produzidos com as enzimas Alcalase e Protamex para os GH de 10 e 20%. 101

ARTIGO III - Atividade antioxidante e anti-hipertensiva apresentada por peptídeos de camarão branco (*Litopenaeus vannamei*)
Tabela 1 – Distribuição da massa molecular (%) dos hidrolisados proteicos de camarão branco com diferentes GH mediante ultrafiltração com membranas de 10 kda e 3 kda. 123
Tabela 2 – Atividade inibitória da enzima conversora da angiotensina (ECA) das frações peptídicas de camarão branco (<3kda) com diferentes GH, obtidos via adição das enzimas Alcalase e Protamex 131

ARTIGO IV - Nanoencapsulação por lipossomas de frações peptídicas de camarão branco (*Litopenaeus vannamei*)
Tabela 1 – Tamanho de partícula (nm) e o índice de polidispersão das nanocápsulas controle (sem peptídeo) e nanocápsulas contendo peptídeos de camarão branco. 151
Tabela 2 – Potencial zeta das nanocápsulas controle (sem peptídeo) e nanocápsulas contendo peptídeos de camarão branco nos tempos de armazenamento de 1 e 7 dias a 4 ºC..... 153
Tabela 3 – Eficiência de encapsulação das nanocápsulas contendo peptídeos de camarão branco 153
Tabela 4 – Captura do radical livre ABTS (%) apresentada pelas frações peptídicas de camarão branco, com diferentes enzimas antes da encapsulação e após processo de encapsulação por lipossomas 156
Tabela 5 – Atividade inibitória da enzima conversora da angiotensina (ECA) apresentada pelas frações peptídicas de camarão branco, antes da encapsulação e após processo de encapsulação em lipossomas 157

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II - REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1 - Camarão branco (*Litopenaeus vannamei*) 33
Figura 2 - Formação de uma ligação peptídica por condensação.....35
Figura 3 - Obtenção de hidrolisado proteico via hidrólise enzimática.....37
Figura 4 - Diagrama para o processo de obtenção de hidrolisados proteicos de pescado via processo enzimático.....38
Figura 5 - Mecanismos utilizados pelos PAMs para interação com a membrana celular: (A) "Barrel steve" (B) "Tapete" (C) "Poro toroidal" (D) "Eletroporação molecular" (E) "Sinking-raft". Regiões vermelhas representam superfície hidrofílica, enquanto que as regiões azuis são hidrofóbicas.....49
Figura 6 - Sistema renina-angiotensina-aldosterona para regulação da pressão arterial.....53
Figura 7 - Estrutura do lipossoma 55
Figura 8 - Representação do esquema de classificação aplicado para lipossomas: (VULP) vesículas unilamelares pequenas, (VULG) vesículas unilamelares grandes (VULGI) vesículas unilamelares gigantes, (VOL) vesículas oligomelares, (VML) vesículas multimelares, (VMV) vesículas multivesiculares 56

CAPÍTULO III – DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

ARTIGO I - Propriedades funcionais e antioxidantes de hidrolisados proteicos de camarão branco (*Litopenaeus vannamei*)

Figura 1 - Fluxograma do processo de obtenção dos hidrolisados proteicos de camarão branco *(Litopenaeus vannamei*) 69
Figura 2 - Solubilidade proteica de hidrolisados proteicos de camarão com diferentes GH, preparados com a Alcalase e a Protamex 75
Figura 3 - Sequestro do radical livre (DPPH) dos hidrolisados proteicos de camarão com diferentes GH, preparados com a Alcalase e a Protamex.....80
Figura 4 - Poder redutor dos hidrolisados proteicos de camarão com diferentes GH, preparados com a Alcalase e a Protamex.....81
Figura 5 - Captura do radical livre ABTS dos hidrolisados proteicos de camarão com diferentes GH, preparados com a Alcalase e a Protamex.....82

ARTIGO II - Efeitos antimicrobiano e antitumoral apresentados por hidrolisados proteicos de camarão branco (*Litopenaeus vannamei*)

Figura 1 - Curvas de hidrólise enzimática do músculo de camarão branco (*Litopenaeus* vannamei) obtidas a partir das enzimas Alcalase e Protamex.....97
Figura 2 - Proliferação celular medida pelo ensaio de MTT das células de Melan-a (2A) e B16F10 (2B) após exposição a diferentes concentrações de hidrolisado proteico de camarão utilizando Alcalase com GH de 20% (A20). 104
Figura 3 - Proliferação celular medida pelo ensaio de MTT das células de Melan-a (3A) e B16F10 (3B) após exposição a diferentes concentrações de hidrolisado proteico de camarão utilizando Protamex com GH de 20% (P20). 105

ARTIGO III - Atividade antioxidante e anti-hipertensiva apresentada por peptídeos de camarão branco (*Litopenaeus vannamei*)

Figura 1 - Atividade sequestradora de radical livre DPPH (%) apresentada pelas frações peptídicas de camarão branco, com diferentes GH, obtidos via adição das enzimas Alcalase e Protamex 125
Figura 2 - Poder redutor apresentado pelas frações peptídicas de camarão branco, com diferentes GH, obtidos via adição das enzimas Alcalase e Protamex..... 127
Figura 3 - Captura do radical livre ABTS (%) apresentada pelas frações peptídicas de camarão branco, com diferentes GH, obtidos via adição das enzimas Alcalase e Protamex 129

ARTIGO IV - Nanoencapsulação por lipossomas de frações peptídicas de camarão branco (*Litopenaeus vannamei*)
Figura 1 - Microscopia eletrônica varredura das nanocápsulas (a) L-A10F3 (B) L-P10F3 . 155

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A10 - Hidrolisados proteicos de camarão com GH de 10% utilizando Alcalase

A10F1- Fração peptídica (> 10kDa) de camarão com GH de 10% utilizando Alcalase

A10F2 - Fração peptídica (3-10kDa) de camarão com GH de 10% utilizando Alcalase

A10F3 - Fração peptídica (< 3kDa) de camarão com GH de 10% utilizando Alcalase

A20 - Hidrolisados proteicos de camarão com GH de 20% utilizando Alcalase

A20F1- Fração peptídica (> 10kDa) de camarão com GH de 20% utilizando Alcalase

A20F2 - Fração peptídica (3-10kDa) de camarão com GH de 20% utilizando Alcalase

A20F3 - Fração peptídica (< 3kDa) de camarão com GH de 20% utilizando Alcalase

AH – Ácido hipúrico

ANOVA - Análise de variância

B - Volume de base consumida

BFT - Biofloc Technology

BHI - Brain Heart Infusion

CLAE - Cromatografia liquida de alta eficiência

DLS - Espalhamento dinâmico de luz

DTA - Doenças transmitidas por alimentos

ECA - Enzima conversora da angiotensina – I

EE (%) - Eficiência de encapsulação

EE - Estabilidade de espuma

EIE - Estabilidade do índice de emulsificação

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations

FE - Formação de espuma

GH - Grau de hidrólise

HA - Hipertensão arterial

HHL – Hipuril-histidil-leucina

h_{tot} - Número de ligações peptídicas

IE - Índice de emulsificação

MEV - Microscopia eletrônica de varredura

MP - Massa de proteína

MTT - 3-4,5-dimetiltiazol-2-il,2,5-difeniltetrazolium

n - Número de móis de ligações peptídicas clivadas por mol de proteína.

Nb - Normalidade da base

nt - Número total de móis de ligações peptídicas em um mol de proteína

P10 - Hidrolisados proteicos de camarão com GH de 10% utilizando Protamex

P10F1 - Fração peptídica (>10kDa) de camarão com GH de 10% utilizando Protamex

P10F2 - Fração peptídica (3-10kDa) de camarão com GH de 10% utilizando Protamex

P10F3 - Fração peptídica (<3kDa) de camarão com GH de 10% utilizando Protamex

P20 - Hidrolisados proteicos de camarão com GH de 20% utilizando Protamex

P20F1 - Fração peptídica (> 10kDa) de camarão com GH de 20% utilizando Protamex

P20F2 - Fração peptídica (3-10kDa) de camarão com GH de 20% utilizando Protamex

P20F3 - Fração peptídica (<3kDa) de camarão com GH de 20% utilizando Protamex

PAMs - Peptídeos antimicrobianos

PDI - Índice de polidispersão

PE - Peptídeo encapsulado

PT - Peptídeo total

PNE - Peptídeo não-encapsulado

pH - Potencial hidrogeniônico

pk - Constante de dissociação

T - Temperatura

VML - Vesículas multimelares

VMV - Vesículas multivesiculares

VOL - Vesículas oligomelares

VULG - Vesículas unilamelares grandes

VULGI - Vesículas unilamelares gigantes

VULP - Vesículas unilamelares pequenas

α - Grau de dissociação

SUMÁRIO

CAPÍTULO I **13**
RESUMO GERAL **23**
1 INTRODUÇÃO **27**
2 OBJETIVOS **29**
2.1 OBJETIVO GERAL 29
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 29

CAPÍTULO II **31**
3 REVISÃO DA LITERATURA **33**
3.1 CAMARÃO BRANCO 33
3.2 PROTEÍNAS DE ORGANISMOS AQUÁTICOS 34
3.3 HIDROLISADOS PROTEICOS DE PESCADO 36
3.3.1 Obtenção de hidrolisados proteicos de pescado via enzimática **37**
3.3.2 Enzimas proteolíticas **39**
3.3.3 Grau de hidrólise **40**
3.3.4 Propriedades funcionais **42**
3.4 PEPTÍDEOS BIOATIVOS 43
3.4.1 Tecnologias de separação de peptídeos utilizando membranas **44**
3.4.2 Propriedades bioativas **45**
3.4.2.1 Propriedade antioxidante 45
3.4.2.2 Propriedade antimicrobiana 47
3.4.2.3 Propriedade Antitumoral 50
3.4.2.4 Propriedade anti-hipertensiva 52
3.5 ENCAPSULAÇÃO DE COMPOSTOS ATIVOS 54
3.5.1 Generalidades **54**
3.5.2 Encapsulação por lipossomas **55**

CAPÍTULO III **59**
APRESENTAÇÃO **61**

ARTIGO I PROPRIEDADES FUNCIONAIS E ANTIOXIDANTES DE HIDROLISADOS PROTEICOS DE CAMARÃO BRANCO (*LITOPENAEUS VANNAMEI*) 63
RESUMO **65**
1 INTRODUÇÃO **67**
2 MATERIAL E MÉTODOS **68**
2.1 MATERIAL 68
2.2 MÉTODOS 68
2.2.1 Obtenção de hidrolisados proteicos de camarão branco **68**
2.2.2 Grau de Hidrólise **69**
2.2.3 Composição de aminoácidos **70**
2.2.4 Propriedades Funcionais **70**
2.2.4.1 Solubilidade Proteica 70
2.2.4.2 Propriedades de Espuma 71
2.2.4.3 Propriedades Emulsificantes 71
2.2.5 Propriedade Antioxidante **72**
2.2.5.1 Sequestro do radical livre DPPH 72
2.2.5.2 Poder Redutor 72

2.2.5.3 Captura do radical ABTS $^{+}$ 73
2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA 73
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 73
3.1 COMPOSIÇÃO AMINOACÍDICA 73
3.2 PROPRIEDADES FUNCIONAIS DOS HIDROLISADOS 75
3.2.1 Solubilidade 75
3.2.2 Propriedades de Espuma 76
3.2.3 Propriedades Emulsificantes 78
3.3 PROPRIEDADE ANTIOXIDANTE DOS HIDROLISADOS 80
3.3.1 Sequestro do radical livre DPPH 80
3.3.2 Poder Redutor 81
3.3.3 Captura do radical ABTS^{+} 82
4 CONCLUSÃO 83
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 83

ARTIGO II EFEITOS ANTIMICROBIANO E ANTITUMORAL APRESENTADOS POR HIDROLISADOS PROTEICOS DE CAMARÃO BRANCO (*LITOPENAEUS VANNAMEI*) 87
1 INTRODUÇÃO 91
2 MATERIAL E MÉTODOS 92
2.1 MATERIAL 92
2.1.1 Matéria-prima 92
2.1.2 Enzimas e Reagentes 93
2.2 MÉTODOS 93
2.2.1 Obtenção dos hidrolisados proteicos de camarão branco 93
2.2.2 Composição aminoacídica dos hidrolisados proteicos de camarão branco 94
2.2.3 Avaliação da atividade antimicrobiana 94
2.2.3.1 Micro-organismos 94
2.2.3.2 Reativação dos micro-organismos 94
2.2.3.3 Disco de difusão 94
2.2.4 Atividade antitumoral 95
2.2.4.1 Células e condição de cultura 95
2.2.4.2 Viabilidade Celular 95
2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA 96
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 96
3.1 GRAU DE HIDRÓLISE 96
3.2 COMPOSIÇÃO DE AMINOÁCIDOS 98
3.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA 101
3.4 ATIVIDADE ANTITUMORAL 103
4 CONCLUSÃO 106
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 106

ARTIGO III ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTI-HIPERTENSIVA APRESENTADA POR PEPTÍDEOS DE CAMARÃO BRANCO (*LITOPENAEUS VANNAMEI*) 113
1 INTRODUÇÃO 117
2 MATERIAL E MÉTODOS 118
2.1 MATERIAL 118
2.1.1 Matéria-prima 118
2.1.2 Enzimas e Reagentes 119

2.2 MÉTODOS 119
2.2.1 Obtenção de hidrolisados proteicos do camarão branco *(Litopenaeus vannamei)*..... 119
2.2.2 Ultrafiltração 119
2.2.3 Avaliação da Atividade Antioxidante 120
2.2.3.1 Sequestro do Radical Livre DPPH 120
2.2.3.2 Poder Redutor 121
2.2.3.3 Captura do radical $ABTS^{\cdot+}$ 121
2.2.4 Avaliação da Atividade Anti-hipertensiva 122
2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA 122
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 122
3.1 ULTRAFILTRAÇÃO 122
3.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE 123
3.2.1 Sequestro do Radical Livre DPPH 124
3.2.2 Poder Redutor 126
3.2.3 Captura do radical $ABTS^{\cdot+}$ 128
3.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-HIPERTENSIVA 130
4 CONCLUSÃO 132
5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 132

ARTIGO IV NANOENCAPSULAÇÃO POR LIPOSSOMAS DE FRAÇÕES PEPTÍDICAS DE CAMARÃO BRANCO (*LITOPENAEUS VANNAMEI*) 139
1 INTRODUÇÃO 143
2 MATERIAL E MÉTODOS 144
2.1 MATERIAL 144
2.1.1 Matéria-prima 144
2.1.2 Enzimas e reagentes 145
2.2 MÉTODOS 145
2.2.1 Obtenção dos hidrolisados proteicos de camarão branco 145
2.2.2 Obtenção das frações peptídicas de camarão branco 146
2.2.3 Purificação da lecitina de soja bruta 146
2.2.4 Encapsulação por Lipossomas 146
2.2.5 Caracterização dos lipossomas 147
2.2.5.1 Tamanho de partícula e polidispersão 147
2.2.5.2 Estabilidade dos lipossomas 147
2.2.5.3 Microscopia eletrônica de varredura 147
2.2.6 Eficiência de encapsulação (EE) 148
2.2.7 Avaliação da bioatividade dos lipossomas 149
2.2.7.1 Atividade antioxidante 149
2.2.7.2 Avaliação da Atividade Anti-hipertensiva 149
2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA 150
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 150
3.1 TAMANHO DE PARTÍCULA E ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO 150
3.2 ESTABILIDADE DOS LIPOSSOMAS 152
3.3 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO (EE) 153
3.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA 154
3.5 BIOATIVIDADES 155
3.5.1 Avaliação da atividade antioxidante 155
3.5.2 Avaliação da atividade anti-hipertensiva 156
4 CONCLUSÃO 157

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 158

CAPÍTULO IV 163
CONCLUSÃO GERAL 165

CAPÍTULO V 167
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 169

CAPÍTULO I

RESUMO GERAL, GENERAL ABSTRACT, INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS

RESUMO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo geral obter peptídeos bioativos encapsulados a partir da hidrólise enzimática de proteínas do camarão branco (*Litopenaeus vannamei*). A matéria-prima utilizada no trabalho foi o camarão cultivado no sistema da tecnologia de bioflocos (BFT), obtido através de doação da Estação Marinha de Aquicultura (EMA) pertencente a Universidade Federal do Rio Grande (FURG). Os hidrolisados proteicos foram obtidos mediante a hidrólise enzimática com duas proteases comerciais (Alcalase e Protamex). O grau de hidrólise foi monitorado até que a reação atingisse 10 e 20% de hidrólise. Os hidrolisados proteicos de camarão foram obtidos, caracterizados em relação a composição aminoacídica, propriedades funcionais, antioxidantes, antimicrobianas e antitumorais. Posteriormente, foi realizado um fracionamento dos hidrolisados proteicos utilizando uma célula de ultrafiltração com membranas de corte de 3 e 10 kDa. Foram obtidos três grupos de frações peptídicas F1 (>10 kDa), F2 (3-10 kDa) e F3 (<3 kDa). Todas as frações tiveram sua atividade antioxidante avaliada, e as frações F3 foram avaliadas analisando a atividade anti-hipertensiva. Além disso, as frações F3 foram encapsuladas por lipossomas, caracterizadas quanto ao tamanho das partículas, polidispersão, análise morfológica, eficiência de encapsulamento e bioatividade. Os resultados indicaram que o grau de extensão da hidrólise afetou a composição aminoacídica, propriedades funcionais e propriedades bioativas. Um baixo grau de hidrólise (10%) favoreceu às propriedades de formação de espuma, capacidade emulsificante e atividade antioxidante para sequestro do radical DPPH (2,2–difenil–1–picrilhidrazil) e poder redutor, enquanto, que um alto grau de hidrólise (20%) proporcionou maior solubilidade proteica e maior atividade antioxidante capacidade de captura do radical ABTS (2,2´-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico). Além disso, todos os hidrolisados apresentaram uma elevada composição de aminoácidos essenciais. Os hidrolisados apresentaram atividade antimicrobiana frente a todos os micro-organismos testados e o hidrolisado obtido pela ação da enzima Alcalase e grau de hidrólise de 20% apresentou potencial antitumoral e não apresentou efeito citotóxico sobre a linhagem não tumoral. Verificou-se que as frações peptídicas apresentaram elevado potencial antioxidante e anti-hipertensivo. As frações hidrolisadas com a enzima Alcalase apresentaram maior efeito anti-hipertensivo, independente do grau de hidrólise. As cápsulas peptídicas obtidas pelo técnica de lipossomas foram de tamanho nanométrico, baixo índice de polidispersão e elevada estabilidade ao longo do armazenamento à 4 ºC. A fração peptídica hidrolisada com Protamex e GH de 10% apresentou a maior eficiência de encapsulação, superior a 72% e, não teve as atividades antioxidante e anti-hipertensiva afetadas pelo encapsulamento. O desenvolvimento desse trabalho demonstrou que a hidrólise enzimática das proteínas do camarão branco surge como uma importante alternativa para obtenção de hidrolisados proteicos e peptídeos bioativos, compostos naturais que apresentam consideráveis atividades biológicas, tais como atividade antioxidante, antimicrobiana, antitumoral e anti-hipertensiva. Finalmente, esse trabalho mostrou que a técnica de encapsulação por lipossomas é uma metodologia eficaz para produzir nanocápsulas bioativas com elevada estabilidade a partir de peptídeos de camarão branco.

Palavras-chave: Crustáceo. Hidrolisados. Funcionalidade. Bioatividade. Ultrafiltração. Encapsulamento.

GENERAL ABSTRACT

OBTAINING BIOATIVE PEPTIDE ENCAPSULATED FROM ENZYMAL HYDROLYSIS OF SHRIMP (*Litopenaeus vannamei*)

The present study aimed to obtain bioactive peptides encapsulated from the enzymatic hydrolysis of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) proteins. The raw material used was white shrimp cultivated by the biofloc technology (BFT) system, obtained through donation by the Marine Aquiculture Station (EMA) of the Federal University of Rio Grande (FURG). Protein hydrolysates were obtained by enzymatic hydrolysis with two commercial proteases (Alcalase and Protamex). The degree of hydrolysis was monitored until the reaction reached 10 and 20% hydrolysis. Protein hydrolysates of shrimp were obtained, characterized in relation to the amino acid composition, functional, antioxidant and antimicrobial and antitumor properties. Subsequently, a fractionation of the protein hydrolysates was performed using ultrafiltration cells with 3 and 10 kDa cut membranes. Three groups of peptide fractions were obtained, F1 (> 10 kDa), F2 (3-10 kDa) and F3 (< 3 kDa). All fractions had their antioxidant activity evaluated, and the F3 fractions were evaluated by antihypertensive activity. In addition, F3 fractions were encapsulated by liposomes, characterized by particle size, polydispersity, morphological analysis, encapsulation efficiency and bioactivity. The results indicated that the degree of extension affected the amino acid composition, functional and bioactive properties. A low degree of hydrolysis (10%) favored properties of foam, emulsifying capacity and antioxidant activity for sequestration of the radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and reducing power, whereas, a high degree of hydrolysis (20%) provided higher protein solubility and higher antioxidant activity capturing ability of the ABTS radical (2, 2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid). The hydrolysates presented antimicrobial activity against all the tested microorganisms, and the hydrolysate obtained by the action of the enzyme Alcalase and degree of hydrolysis of 20% showed higher antitumor activity and had an a cytotoxic effect on the non-tumoral lineage. It was verified that the peptide fractions presented a high antioxidant and antihypertensive potential. The fractions hydrolyzed with the enzyme Alcalase had a higher antihypertensive effect. The peptide capsules obtained by the liposome technique were of nanometric size, low polydispersity index and high stability throughout the storage at 4 °C. The peptide fraction hydrolyzed with Protamex and GH of 10% showed the highest encapsulation efficiency, higher than 72%, and the antioxidant and antihypertensive activities were not affected by the encapsulation. The development of this work demonstrated that the enzymatic hydrolysis of white shrimp proteins is seen as an important alternative for the preparation of hydrolyzed proteins and bioactive peptides, natural compounds that present considerable biological activities, such as antioxidant, antimicrobial, antitumor and antihypertensive activity. Finally, this work has shown that the liposome encapsulation technique is an effective methodology for producing bioactive nanocapsules with high stability from white shrimp peptides.

Key words: Crustacean. Hydrolysates. Functionality. Bioactivity. Ultrafiltration. Encapsulation.

1 INTRODUÇÃO

Em tempos modernos, os consumidores estão cada vez mais preocupados em manter uma dieta baseada em alimentos funcionais, alimentos estes que além de garantir nutrição básica, proporcionam efeitos benéficos ao organismo humano (ZARDINI et al., 2018; KÜSTER-BOLUDA; VIDAL-CAPILLA, 2017). Dentre os alimentos funcionais, merecem destaque as proteínas, substâncias nitrogenadas que em sua composição apresentam uma elevada fonte de aminoácidos essenciais e peptídeos bioativos (ARYEE; AGYEI; UDENIGWE, 2018).

Os peptídeos bioativos são apontados como excelentes ingredientes funcionais, uma vez que apresentam cadeias e sequências de aminoácidos com capacidade para desempenhar diversas atividades fisiológicas (MOHAN et al., 2018; VILLAMIL; VÁQUIRO; SOLANILLA, 2017). Os peptídeos bioativos são oligopeptídeos que contêm entre dois e vinte aminoácidos que podem exercer efeitos benéficos ao organismo humano, quando liberados através de processos de quebra da estrutura da proteína pelas enzimas digestivas durante o trato gastrointestinal ou durante o processamento de alimentos ou por hidrólise utilizando enzimas comerciais (CHALAMAIAH; YU; WU, 2018; HALIM; YUSOF; SARBON, 2016).

A hidrólise enzimática das proteínas, tanto de origem animal como vegetal, ganha destaque para a obtenção de hidrolisados contendo peptídeos bioativos, quando comparada com a via química, devido às condições brandas e controladas durante este processo (CHALAMAIAH; YU; WU, 2018; COELHO; SALAS-MELLADO, 2017; TANASKOVIĆ et al., 2018). No entanto, muitos autores sugerem que os processos de hidrólise para obtenção de peptídeos bioativos podem ter seus produtos melhorados quando submetidos a processos adicionais de fracionamento após a hidrólise proteica, de modo que esses sistemas resultam em produtos com propriedades e características definidas (ARRUTIA; RUBIO; RIERA, 2016; JANG; LICEAGA; YOON, 2016; WU et al., 2017). Entre as tecnologias de fracionamento, tem-se os processos de separação por membranas, estes oferecem a possibilidade de trabalhar em diferentes escalas, baixo custo e condições brandas de operação, permitindo que o substrato não sofra alterações (TAVARES et al., 2012).

Dentre os peptídeos bioativos, ganham destaque os que apresentam as atividades antioxidante, antimicrobiana, antitumoral e anti-hipertensiva (CAI et al., 2015; CHI et al., 2015; SILA et al., 2014a; SILVA; FONSECA; PRENTICE, 2014; WU; LIAO; UDENIGWE, 2017). Essas atividades biológicas podem ser influenciadas tanto pela sequência quanto pela

composição de aminoácidos, bem como pela afinidade com o substrato (GRIENKE; SILKE; TASDEMIR, 2014). As pesquisas apontam a crescente demanda por tais compostos ativos, dado que os compostos sintéticos que exercem essas atividades ocasionam diferentes efeitos adversos ao organismo (INTARASIRISAWAT et al., 2013).

Os organismos aquáticos são considerados como uma importante fonte de peptídeos que podem exercer diversos benefícios quando inseridos na dieta (LEE; PHAT; HONG, 2017). Dentre as espécies abundantes e passíveis de utilização, tem-se o camarão branco *(Litopenaeus vannamei),* este apresenta potencial significativo de aproveitamento, sendo uma importante fonte de proteínas para a obtenção de hidrolisados proteicos (CHEUNG; LI-CHAN, 2014; DEY; DORA, 2014; HUANG; REN; JIANG, 2014; LATORRES et al., 2018).

Em geral, os peptídeos bioativos são compostos altamente heterogêneos e reativos, características essas que podem afetar negativamente sua estabilidade durante o processamento ou em condições fisiológicas (CELLI; GHANEM; BROOKS, 2015; UDENIGWE, 2014). A encapsulação é uma técnica que tem auxiliado na proteção e tem garantido maior estabilidade dos peptídeos bioativos, uma vez que essa tecnologia é um processo de aprisionamento de materiais sólidos, líquidos ou gasosos, que possui a capacidade de reduzir a volatilidade e reatividade, além de aumentar a estabilidade dos produtos sob condições adversas, e também proporcionar a liberação controlada do material encapsulado em condições pré-estabelecidas (HERNANDEZ-LEDESMA; CHIA-CHIEN, 2013; JAFARI, 2017; MOHAN et al., 2015).

Dentre os processos de encapsulação disponíveis, os lipossomas são apontados como um método ideal para peptídeos, uma vez que são vesículas esféricas com estrutura semelhante à membrana celular, com capacidade de carregar materiais lipofílicos e hidrofílicos em uma única camada (CHUN; MIN; JO, 2017; JEON; YOO; PARK, 2015; MOHAN; MCCLEMENTS; UDENIGWE, 2016). Para Mosquera et al. (2016), os lipossomas apresentam um grande potencial como sistemas de entrega de peptídeos devido à possibilidade de produção em grande escala, utilizando ingredientes naturais como material de parede e aprisionamento e liberação de materiais solúveis em água, lipossolúveis e anfifílicos.

Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo obter peptídeos bioativos encapsulados a partir da hidrólise enzimática de proteínas do camarão branco *(Litopenaeus vannamei).*

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Obter peptídeos bioativos encapsulados a partir da hidrólise enzimática, utilizando como matéria-prima o músculo de camarão branco (*Litopenaeus vannamei*).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter hidrolisados proteicos do músculo de camarão branco utilizando as enzimas Alcalase e Protamex;
- Caracterizar os hidrolisados proteicos com relação à sua composição aminoacídica;
- Avaliar as propriedades funcionais dos hidrolisados proteicos obtidos;
- Avaliar os hidrolisados proteicos como agentes antioxidantes, antimicrobianos e antitumorais;
- Fracionar os hidrolisados mediante ultrafiltração;
- Avaliar as frações peptídicas como agentes antioxidantes e anti-hipertensivos;
- Encapsular as frações peptídicas pela técnica de lipossomas;
- Caracterizar os peptídeos encapsulados quanto ao tamanho das partículas, polidispersão, estabilidade, análise morfológica e eficiência de encapsulação;
- Avaliar o efeito da encapsulação em lipossomas sobre as atividades antioxidante e anti-hipertensiva das frações peptídicas de camarão branco.

CAPÍTULO II

REVISÃO DA LITERATURA

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 CAMARÃO BRANCO

A carcinicultura brasileira vem crescendo desde a década de 1970, a partir de tecnologias importadas e sistemas de cultivo que contribuíram para o Brasil ocupar lugar de destaque na produção de camarão (NATORI et al., 2011). Dentre as espécies de interesse, o *Litopenaeus vannamei*, também conhecido como camarão branco é a espécie de maior cultivo no país, com produção total em 2015 de 70.000 toneladas e projeção para 2018 de 80.000 toneladas (ABCC, 2018). Em relação à escala mundial, a espécie é responsável por 80% da produção, entre todas as espécies de camarão cultivadas no ano de 2014, chegando a 3.666.682 toneladas (FAO, 2016).

A Figura 1 apresenta a espécie denominada de camarão branco, pertencente ao Filo *Arthropoda*, Classe Crustácea, Ordem *Decapoda*, Família *Penaeidae* e Gênero *Penaeus* (FAO, 1980). Essa espécie é nativa da costa sul americana do Oceano Pacífico, desde o Peru até o México, com acentuada predominância na faixa costeira do Equador, sendo cultivada em todos os países produtores de camarão do mundo ocidental (ICTIO TERM, 2018).

Figura 1 - Camarão branco (*Litopenaeus vannamei*)

Fonte: ICTIO TERM (2018)

De acordo com Lara et al. (2017), o camarão é um produto importante no mercado mundial de crustáceos e praticamente toda a produção de *Litopenaeus vannamei* é obtida através da aquicultura. Dentre os sistemas de cultivo, o sistema que utiliza a tecnologia de bioflocos (Biofloc Technology - BFT) foi considerada uma alternativa eficaz na produção

intensiva de camarões, com elevada produtividade e redução de riscos de patologias (BURFORD et al., 2004; DE SOUZA et al., 2016). Os bioflocos são compostos agregados, formados a partir do carbono e nitrogênio dissolvidos nos tanques de cultivo, que são aproveitados pelos micro-organismos do sistema e transformados em biomassa microbiana. Esses agregados, além de melhorar a qualidade da água, servem de alimento para os camarões, tornando o sistema seguro, sustentável e com baixas taxas de troca de água nos tanques de cultivo (AVNIMELECH, 1999; FORSTER, 1976; KRUMMENAUER et al., 2012; VILANI et al., 2016).

O processamento industrial do camarão gera uma quantidade significativa de resíduos, constituindo aproximadamente de 50 a 70% da sua massa total (ARANCIBIA et al., 2014; DE HOLANDA; NETTO, 2006). Com isso, maior atenção tem sido dada para a utilização desses subprodutos, cujas pesquisas envolvem, dentre outros aspectos, extração de quitina (ARANCIBIA et al., 2015; SJAIFULLAH; SANTOSO, 2016; SRINIVASAN; KANAYAIRAM; RAVICHANDRAN, 2017), carotenoides (RAZI PARJIKOLAEI et al., 2015), peptídeos bioativos (AMBIGAIPALAN; SHAHIDI, 2017;; DEY; DORA, 2014a; KLEEKAYAI et al., 2015). Entretanto, existe uma carência de estudos acerca da fração comestível do camarão, constituindo uma estratégia inovadora para novas pesquisas, uma vez que o músculo da espécie é caracterizado como um produto de excelente valor nutricional, baixa concentração de lipídios totais e colesterol, sendo o seu teor proteico comparável à proteína padrão da *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) (ABDEL-SALAM, 2013; ARAUJO et al., 2012; BONO et al., 2016; GALVÃO; OETTERER, 2014; SRIKET et al., 2007).

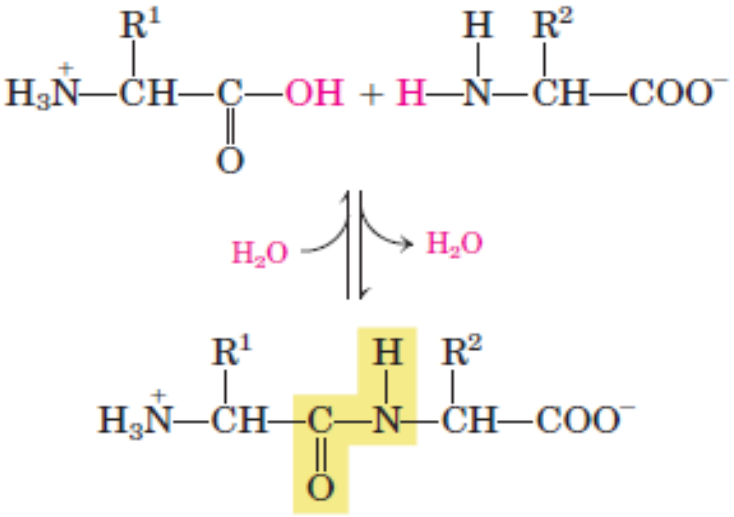
3.2 PROTEÍNAS DE ORGANISMOS AQUÁTICOS

As proteínas são as biomoléculas constituídas principalmente por carbono, hidrogênio, oxigênio, e nitrogênio, e com o elemento minoritário apresentam o enxofre, em cerca de 0,2 a 3% (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). Estas são consideradas ferramentas de manutenção da vida, desempenhando diversas funções fisiológicas, estruturais e com valor nutritivo (ORDÓÑEZ, 2005).

Em termos estruturais, são polímeros complexos, compostos por 21 aminoácidos ligados através de ligações peptídicas formando longas cadeias em várias estruturas geométricas (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). A ligação peptídica é formada através de um processo de desidratação pela remoção das moléculas de água de um grupo α-

carboxil de um aminoácido e o grupo α-amino de outro aminoácido, conforme apresentado na Figura 2 (NELSON; COX, 2011).

Figura 2 - Formação de uma ligação peptídica por condensação
Fonte: Nelson e Cox (2011)



As proteínas podem ser classificadas de acordo com a sua solubilidade, em sarcoplasmáticas, miofibrilares, e insolúveis ou do estroma (ORDÓÑEZ, 2005). As proteínas sarcoplasmáticas desempenham funções bioquímicas na célula e possuem solubilidade em água e soluções salinas; as proteínas miofibrilares representam a estrutura contrátil e são responsáveis pela retenção de água, enquanto que as proteínas insolúveis ou do estroma são do tecido conectivo responsáveis por garantir a integridade do músculo (OETTERER; REGITANO-D'ARCE; SPOTO, 2010).

Do ponto de vista nutricional, as proteínas do pescado apresentam elevado valor biológico, em razão de apresentar todos os aminoácidos essenciais na sua composição (GALVÃO; OETTERER, 2014). Em termos de digestibilidade, as proteínas do pescado quando comparadas às de outras carnes, apresentam elevada digestibilidade, atribuída à maior fração miofibrilar, cuja digestibilidade é superior a das proteínas do tecido conjuntivo (CONTRERAS-GUZMÁN, 1994).

As propriedades e funcionalidade das proteínas dependem de vários fatores como sequência e composição aminoacídica, conformação, carga líquida, capacidade de reação com outros compostos (ARYEE; AGYEI; UDENIGWE, 2018). Diversos pesquisadores utilizam as propriedades funcionais dos organismos aquáticos para produzir alimentos funcionais ou

melhorar as propriedades dos alimentos (CORTEZ-VEGA et al., 2017; FAGUNDES; ROCHA, SALAS-MELLADO, 2018; RODRIGUES et al., 2017; PIOTROWICZ; MELLADO, 2015). Além disso, as proteínas marinhas possuem uma grande variedade de componentes bioativos, sob a forma de peptídeos que possuem um impacto positivo sobre a saúde (SALAMPESSY et al., 2017). As funções fisiológicas dos peptídeos bioativos incluem atividades como antioxidante (SUWAL et al., 2018), antidiabética (HARNEDY et al., 2018), antinflamatória (GU; WU, 2016), antimicrobiana (SEDAGHATI et al., 2016), anti-hipertensiva (KO et al., 2016; WU et al., 2017), antitumoral (UMAYAPARVATHI et al., 2014), entre outras.

3.3 HIDROLISADOS PROTEICOS DE PESCADO

Os hidrolisados proteicos de pescado são produtos obtidos através da hidrólise de proteínas pela ação de enzimas que hidrolisam a sua proteína nativa, isolando a fração proteica (MOLLA; HOVANNISYAN, 2011). Esses compostos proteicos são produzidos com o objetivo de solubilizar a fração proteica do pescado para melhorar o seu valor biológico e nutricional visando a obtenção de produtos de alto valor agregado e interesse comercial (NILSANG et al., 2005).

De acordo com Nesse et al. (2014), os hidrolisados proteicos provenientes de organismos aquáticos são considerados como importantes suplementos nutricionais e apresentam uma ampla variedade de aplicações, considerando que são compostos que podem ser facilmente absorvidos e que possuem a capacidade de desempenhar diferentes atividades metabólicas no organismo. Diferentes fontes proteicas já foram utilizadas para a obtenção de hidrolisados proteicos, incluindo músculo, vísceras, cabeças, escamas, entre outros (ZAVAREZE et al., 2014; ISHAK; SARBON, 2018; SILVA; FONSECA; PRENTICE, 2014).

O processo de hidrólise altera as propriedades das proteínas diminuindo sua massa molecular, aumentando o número de grupos ionizáveis e permitindo a exposição de grupos hidrofóbicos, gerando assim produtos que podem ser utilizados na elaboração de alimentos funcionais, suplementos dietéticos e nutracêuticos (VILLAMIL; VÁQUIRO; SOLANILLA, 2017). A incorporação dos hidrolisados em formulações de alimentos é devida às suas propriedades diferenciadas como solubilidade, formação de espuma, emulsificação e capacidade de retenção de água e óleo (CHALAMAIAH et al., 2012; CHO et al., 2014; ZAVAREZE et al., 2009; NESSE et al., 2014; POKORA et al., 2013). Além da incorporação em diferentes sistemas alimentares a base de cereais, bebidas e produtos cárneos, os hidrolisados de pescado desempenham um papel importante na prevenção e controle de doenças

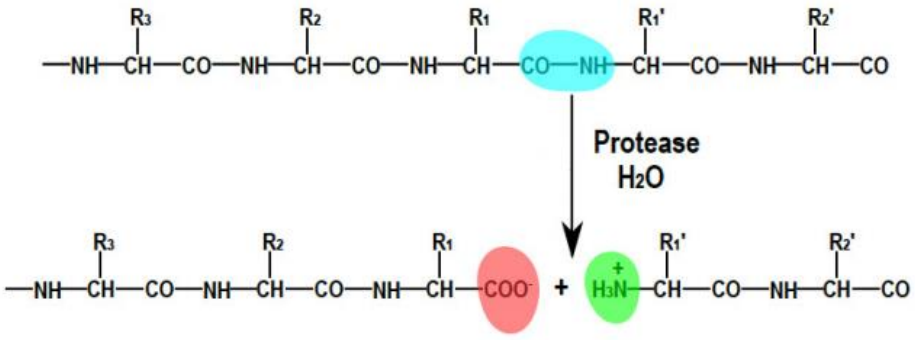
crônicas através de aplicações nutracêuticas, como agentes anti-inflamatórios, controladores de diabetes, redutores da pressão arterial, reguladores de massa e inibidores do estresse oxidativo (CHALAMAIAH; YU; WU, 2018; NOBILE et al., 2016; SILA et al., 2015; SILA; BOUGATEF, 2016; SLIZYTE et al., 2016).

3.3.1 Obtenção de hidrolisados proteicos de pescado via enzimática

Os hidrolisados proteicos de pescado podem ser obtidos via processos químicos, enzimáticos e fermentativos (HALIM; YUSOF; SARBON, 2016). Entretanto, o processo de hidrólise enzimática é o método mais utilizado para produzir hidrolisados proteicos por resultar em produtos considerados seguros e saudáveis. Além disso, a hidrólise enzimática ganha destaque devido à ausência de resíduos de solventes orgânicos e geração de produtos tóxicos, e por possibilitar um tempo de processo menor quando comparada aos processos fermentativos (SALEM et al., 2017).

Na hidrólise enzimática ocorre a quebra da ligação peptídica entre os aminoácidos, pela adição de uma molécula de água, conforme apresentado na Figura 3 (RUTHERFURD; GILANI, 2009). Na reação de hidrólise, para cada ligação peptídica clivada ocorre liberação de um mol de grupo carboxila e um mol de grupo amino (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

Figura 3 - Obtenção de hidrolisado proteico via hidrólise enzimática

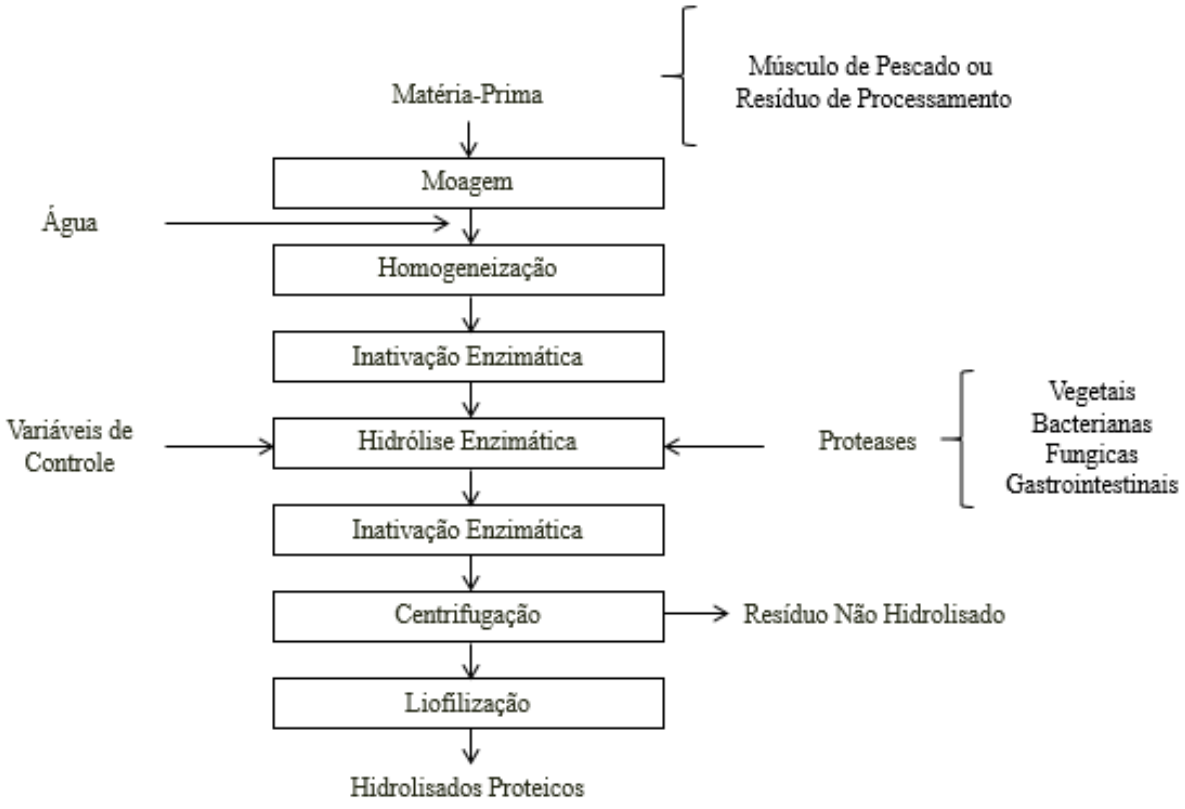


Fonte: Baker e Numata (2013)

Segundo Halim, Yusof e Sarbon (2016), a hidrólise enzimática é utilizada para produzir hidrolisados bioativos através da adição de proteases, tais como alcalase, flavourzyme,

pepsina, protamex, bromelina, tripsina, pancreatina e α-quimiotripsina. Estas proteases podem ser obtidas a partir de fontes bacterianas, vegetais, fúngicas ou gastrointestinais. De acordo com Gonçalves (2011) para dar início no processo de hidrólise é necessário formar uma solução homogênea contendo água e fração proteica em proporções adequadas, conforme apresentado na Figura 4. Posteriormente, deve-se adicionar uma protease à essa solução, e as condições de reação de tempo, pH e temperatura devem ser controladas, de acordo com a enzima adicionada. Após, a enzima deve ser submetida a um processo de inativação. E finalmente, a suspensão deve ser centrifugada para separação da fração solúvel, obtendo os hidrolisados proteicos após secagem.

Figura 4 - Diagrama para o processo de obtenção de hidrolisados proteicos de pescado via processo enzimático



Fonte: Sila e Bougatef (2016)

A hidrólise enzimática deve ser mantida sob condições ótimas de atuação da enzima. Variações de pH devem ser controladas com o auxílio de soluções básicas ou ácidas (CLEMENTE, 2001). A seleção da enzima e a utilização de condições de hidrólise adequadas,

como a relação enzima-substrato, temperatura, pH e tempo de duração da hidrólise influenciam na qualidade dos hidrolisados proteicos (SILA; BOUGATEF, 2016).

3.3.2 Enzimas proteolíticas

As enzimas proteolíticas também denominadas de proteases constituem um grande grupo de enzimas que catalisam a quebra das ligações peptídicas presente nas proteínas, liberando peptídeos de tamanho variável ou aminoácidos livres (RAWLINGS et al., 2014). O termo protease é devido a capacidade dessas enzimas em hidrolisar proteínas (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

As proteases podem ser classificadas de acordo com a sua fonte (animal, vegetal ou microbiana), tipo de reação catalítica (endopeptidase e exopeptidase) e natureza química do sítio catalítico. O local de ação catalítica define se uma protease é endopetidase ou exopeptidase, proteases que clivam as ligações peptídicas nas extremidades da cadeia são classificadas como exopeptidases, enquanto que as que clivam no interior da cadeia são conhecidas como endopeptidases. A natureza química do sítio catalítico vai definir se as proteases serão classificadas como serina, cisteína, aspárticas ou metaloproteases, dependendo do tipo de aminoácido ou íon metálico presente no seu sítio ativo (AGUILAR; SATO, 2018; MURI, 2014; SUMANTHA; LARROCHE; PANDEY, 2006).

Diversas proteases já foram utilizadas na tecnologia de alimentos, em produtos químicos e farmacêuticos (AGUILAR; SATO, 2018). Além disso, esse grupo de enzimas é extensivamente utilizado na produção de hidrolisados proteicos de pescado (ZAVAREZE et al., 2014; DOS SANTOS et al., 2011; JANG; LICEAGA; YOON, 2016; MORALES-MEDINA et al., 2016; SALAMPESSY et al., 2017; SILVA; FONSECA; PRENTICE, 2014). Dentre as proteases utilizadas nos processos de hidrólise a Alcalase e Protamex são amplamente empregadas.

A Alcalase é uma endopeptidase produzida por fermentação submersa do micro-organismo *Baccilus licheniformis* sendo considerada a principal enzima a ser utilizada na produção de hidrolisados proteicos, essa protease é uma serina protease, que possui no seu sitio ativo uma tríade catalítica composta pelos aminoácidos serina, histidina e ácido aspártico (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010; MURI, 2014). Segundo Aguilar e Sato (2018) a alcalase apresenta elevada atividade quando submetida a uma faixa de pH 6,5 a 8,5, temperatura de 50 a 60 °C, enquanto que a enzima protamex é uma mistura de endo e exopeptidase obtida a

partir do *Baccilus subtilis,* que possui condição ótima de atuação a uma faixa de pH de 7 a 8 e temperatura ótima de atuação a 50 e 60 ºC.

3.3.3 Grau de hidrólise

O grau de hidrólise (GH) é definido como o percentual de ligações peptídicas clivadas durante o processo de hidrólise, em relação ao número total de ligações peptídicas de uma proteína, conforme apresentado na Equação 1 (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

$$\% \text{ GH} = \frac{n}{n_t} \text{ x } 100 \qquad (1)$$

Onde n_t é o número total de móis de ligações peptídicas em um mol de proteína, n é o número de móis de ligações peptídicas clivadas por mol de proteína.

Segundo Panyam e Kilara (1996), as proteínas intactas têm valor de GH de 0% e uma proteína completamente hidrolisada tem valor de GH de 100%. O mesmo autor ainda afirma que o processo de clivagem das ligações peptídicas resulta na diminuição da massa molecular da molécula, aumento do número de grupos ionizáveis e exposição de grupos hidrofóbicos que estavam protegidos na estrutura original da proteína.

Existem diferentes métodos que determinam o GH durante a clivagem das ligações peptídicas. O GH pode ser quantificado através da quantidade de nitrogênio solúvel liberada durante a hidrólise devido a presença de um agente precipitante, como o ácido tricloroacético. Também pode ser quantificado pela determinação dos grupos aminos liberados durante a reação de hidrolise através da titulação com formol ou utilizando compostos que reagem especificamente com grupo amino, tais com o ácido trinitrobenzenosulfonico (TNBS) e o-phthaldialdehido (OPA). Entretanto o método de pH-stat é o mais utilizado, onde os prótons liberados durante a hidrólise são titulados e, em seguida, relacionados com GH. No método pH-stat, o pH da solução proteica é mantido em pH constante pela titulação com hidróxido de sódio (RUTHERFURD, 2010; SPELLMAN et al., 2003). O princípio desse método é baseado no fato de que quando a ligação peptídica é hidrolisada, o grupo carboxila formado ioniza-se por completo em um pH> 7, liberando um íon H^+. Consequentemente, o pH da solução proteica diminui progressivamente com o tempo de hidrólise, e na faixa de pH entre 7-8, o número de

móis de íon H^+ liberado é equivalente ao número de móis das ligações peptídicas hidrolisadas (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

O GH é utilizado para acompanhar o grau de extensão da reação de hidrólise durante a clivagem das ligações peptídicas pela ação de uma protease, sendo influenciado pela afinidade das enzimas com a estrutura da proteína e condições de processo (pH, temperatura, tempo) (BKHAIRIA et al., 2016). Salem et al. (2017) hidrolisaram proteínas do músculo de polvo *(Octopus vulgaris)* utilizando a enzima comercial Esperase, um extrato de protease alcalina de Zebra blenny (*Salaria basílica*) e uma protease bruta preparada a partir de *Bacillus subitilis* A26. Os hidrolisados proteicos apresentaram diferentes grau de hidrólise (GH de 17,6 a 21%) devido à especificidade de quebra de cada enzima utilizada durante o processo de hidrólise. Noman et al. (2018) estudaram o efeito de diferentes condições de hidrólise sobre o GH de hidrolisados proteicos de esturjão chinês *(Acipenser sinensi)* obtidos pela adição de papaína. Os parâmetros estudados foram relação de sólido/líquido, enzima/substrato, pH, temperatura e tempo de reação. As condições ótimas foram atingidas com GH de 24,89% para uma relação de sólido/ liquido de 1:1, enzima substrato de 3%, pH 6, temperatura de 70 °C e tempo de reação de 6 h.

As atividades biológicas dos hidrolisados proteicos estão intimamente relacionadas a diferentes parâmetros da reação, como GH, a especificidade da enzima, as condições físico-químicas da reação. O GH exerce influência sobre as propriedades biológicas dos peptídeos gerados durante a hidrólise, porque afeta a composição de aminoácidos, bem como o tamanho e estrutura da molécula (JANG; LICEAGA; YOON, 2016). Nesse sentido, Nasri et al. (2014) apontam que o grau de hidrólise deve ser controlado para obter hidrolisados proteicos com propriedades biológicas reprodutíveis e elevado valor nutricional. Chi et al. (2015) estudaram a influência da composição aminoacídica e dos perfis de peptídeos sobre as propriedades antioxidantes de hidrolisados proteicos de atum (*Katsuwonus pelamis*) e relataram que os comprimentos das cadeias peptídicas afetam as propriedades biológicas do hidrolisados. Além disso, o GH tem efeitos positivos ou negativos sobre as propriedades funcionais dos hidrolisados proteicos (KLOMPONG et al., 2007; LIU et al., 2014; SALEM et al., 2017; SOUISSI et al., 2007; TAHERI et al., 2013). A extensão da hidrólise influencia na massa molecular dos peptídeos, geralmente um menor grau de hidrólise resulta em hidrolisados com excelentes propriedades funcionais, com exceção para solubilidade proteica que indica que hidrolisados com maiores grau de hidrólise são mais solúveis, uma vez que a quebra excessiva resulta em estrutura de menor tamanho e com aumento da exposição de grupos hidrofílicos (PUTRA; ISHAK; SARBON, 2018).

3.3.4 Propriedades funcionais

O termo “funcional” é definido como toda propriedade não nutricional que influi no desempenho da proteína em diferentes matrizes de alimentos, desde os estágios do processamento até o consumo (VILLAMIL; VÁQUIRO; SOLANILLA, 2017). De acordo com Aguilar e Sato (2018), as propriedades funcionais dos hidrolisados são propriedades físico-químicas que norteiam o seu comportamento dentro das matrizes alimentares durante toda a preparação até o consumo. Muitas são as propriedades funcionais estudadas, dentre elas destacam-se a solubilidade proteica, capacidade de retenção de água e óleo, propriedades de espuma, capacidade de gelificação e emulsificação.

As propriedades funcionais dos hidrolisados proteicos contribuem para a aplicação desses compostos em diferentes setores da indústria de desenvolvimento de produtos para nutrição humana, animal e até para indústria farmacêutica (HALIM; YUSOF; SARBON, 2016). He et al. (2016) descobriram que a capacidade emulsificante (69,7 m^2/g) de hidrolisados proteicos de lagosta pode ser superior à capacidade emulsificante de emulsificantes comerciais (50,3 m^2/g), comumente utilizados na indústria de alimentos. Esses resultados demonstram que os hidrolisados proteicos marinhos surgem como importantes agentes de emulsão passíveis de utilização na formulação de alimentos. Salem et al. (2017) verificaram que a hidrólise enzimática melhorou consideravelmente a solubilidade das proteínas de polvo em uma ampla faixa de pH testada. As proteínas nativas apresentaram uma solubilidade menor quando comparadas aos hidrolisados proteicos de polvo.

A funcionalidade proteica dos hidrolisados é afetada por propriedades intrínsecas das proteínas (propriedades físico-químicas, estrutura proteica, conformação, composição de aminoácidos, hidrofobicidade e hidrofilicidade) e fatores extrínsecos (condições de processo) (pH, enzima, temperatura, tempo) (ARYEE; AGYEI; UDENIGWE, 2018; KRISTINSSON; RASCO, 2000). Assim, é possível controlar as condições de processo visando a obtenção de hidrolisados com as características desejadas.

Dos Santos et al. (2011) estudaram as propriedades funcionais de hidrolisados proteicos de cabrinha *(Prionotus punctatus)* obtidos via hidrólise enzimática pela ação das enzimas Alcalase e Flavourzyme. Os autores verificaram que o tipo de enzima influenciou nas propriedades funcionais dos hidrolisados, e que hidrolisados com boa solubilidade geralmente apresentam reduzida capacidade emulsificante e de retenção de água e óleo. Comportamento semelhante foi observado por Liu et al. (2014) em seus estudos com hidrolisados proteicos de subprodutos de carpa prateada (*Hypophthalmichthys molitrix*) nos quais verificaram que a

especificidade da enzima, assim como o grau de hidrólise, afetam as propriedades funcionais dos hidrolisados proteicos.

Egerton et al. (2018) estudaram a obtenção de hidrolisados proteicos de verdinho *(Micromesistius poutassou)* e a sua utilização na suplementação de bebidas. Os autores verificaram que os hidrolisados obtidos a partir de diferentes enzimas apresentaram solubilidade proteica superior a 80% em uma ampla faixa de pH e quando incorporados nas bebidas a solubilidade proteica foi aumentada para 85%. Ainda, foi possível concluir que os hidrolisados com maior GH foram os que apresentaram maior solubilidade e que o tipo de enzima utilizada influenciou na massa molecular dos peptídeos e consequentemente nas propriedades antioxidativas dos hidrolisados.

3.4 PEPTÍDEOS BIOATIVOS

Os peptídeos bioativos são sequências de fragmentos de proteínas específicas contendo de 2 a 20 aminoácidos que quando ingeridos apresentam efeitos positivos sobre a saúde dos consumidores (CHALAMAIAH; YU; WU, 2018). Esses compostos não possuem qualquer bioatividade dentro da estrutura original da proteína, podendo ser liberados mediante processos gastrointestinais, processos fermentativos ou através de reações de hidrólises catalisadas com uma ou mais proteases (HERNANDEZ-LEDESMA; CHIA-CHIEN, 2013).

A estrutura dos peptídeos é semelhante às proteínas, ao serem compostos de aminoácidos, mas diferem no tamanho da cadeia, apresentando menor número de resíduos de aminoácidos quando comparados com as proteínas. Em geral, a massa molecular média desses compostos é <10 kDa, enquanto as proteínas têm tamanhos superiores a 10 kDa (ROTIMI E. ALUKO, 2012). O tamanho reduzido dos peptídeos bioativos quando comparado com a estrutura intacta da proteína, confere uma maior biodisponibilidade do composto ativo (RYDER et al., 2016).

Os processos de liberação dos peptídeos bioativos conferem inúmeras bioatividades a esses compostos (HALIM; YUSOF; SARBON, 2016). Neves et al. (2017) verificaram em seu estudo que o processo de hidrólise via ação proteolítica sobre as proteínas de salmão *(Salmo salar)* conferiu excelentes propriedades anti-hipertensivas, antioxidativas e antidiabéticas a essa fonte proteica. Da mesma forma, Ambigaipalan e Shahidi (2017) elucida as diferentes bioatividades apresentadas pelos peptídeos bioativos a partir da hidrólise proteica de resíduos de camarão. Os autores produziram diferentes compostos ativos utilizando várias enzimas, que posteriormente foram analisados quanto ao seu potencial antioxidante e anti-hipertensivo.

Todos os compostos produzidos apresentaram capacidade antioxidativa frente aos métodos estudados, e ainda foi possível identificar peptídeos bioativos com capacidade anti-hipertensiva através de cromatografia de filtração em gel.

De acordo com Villamil, Váquiro e Solanilla (2017), o potencial destes peptídeos bioativos para reduzir o risco de doenças crônicas e promover a saúde humana tem despertado crescente interesse científico e comercial ao longo dos últimos anos, uma vez que são compostos obtidos a partir de fontes naturais e não exercem efeitos colaterais quando ingeridos. Em geral os peptídeos bioativos podem ser obtidos a partir de diferentes fontes proteicas sejam elas de origem animal ou vegetal (AWAD et al., 2016; EVANGELHO et al., 2017; TANASKOVIĆ et al., 2018; YU; FIELD; WU, 2018). Entretanto, estudos reportam que peptídeos provenientes de organismos marinhos exercem consideráveis funções fisiológicas, como atividade antioxidante, antimicrobiana, antitumoral e anti-hipertensiva devido a composição balanceada de aminoácidos na sua estrutura (KLEEKAYAI et al., 2015; LEE; PHAT; HONG, 2017; SILA et al., 2014a; SILA; BOUGATEF, 2016).

3.4.1 Tecnologias de separação de peptídeos utilizando membranas

Os peptídeos bioativos são misturas complexas de aminoácidos obtidas a partir da hidrólise proteica que apresentam diferentes atividades biológicas. A tecnologia de separação por membranas tem sido utilizada após o processo de hidrólise visando o aumento das bioatividades dos peptídeos ou como forma de separação para posterior identificação da estrutura (ANDERSON; MOORE, 2004; BOURSEAU et al., 2009). O fracionamento dos peptídeos tem como base a separação dos compostos através da discriminação de pequenas diferenças de carga, tamanho e hidrofobicidade, podendo ser empregado para obter frações peptídicas com maior funcionalidade ou maior valor nutricional através de uma forma mais purificada (ABEJÓN et al., 2018).

Os processos de separação por membranas baseiam-se na permeabilidade seletiva de um ou mais dos componentes líquidos pela aplicação de uma força matriz (HERNANDEZ-LEDESMA; CHIA-CHIEN, 2013). As propriedades de retenção das membranas estão relacionadas através do tamanho dos seus poros, sendo caracterizadas através da massa molecular de corte ou *"cut off"*. O *"cut off"* de uma membrana é definido como a menor massa molar retida com eficiência de no mínimo 90% pela membrana (CENTENARO et al., 2014; ROSENBERG, 1995).

Diversos trabalhos utilizaram a tecnologia de membranas para separar os peptídeos bioativos de pescado baseados em diferentes massas moleculares de corte (CAI et al., 2015; CENTENARO et al., 2014; RAGHAVAN; KRISTINSSON, 2009; WU et al., 2017). Ngo et al. (2016) estudaram as propriedades anti-hipertensivas de diferentes frações peptídicas de bacalhau do pacífico. Os autores verificaram que a fração de menor massa molecular foi a que apresentou o maior efeito anti-hipertensivo. Em geral, as propriedades bioativas dos peptídeos são influenciadas pela massa molecular, sendo as de menor tamanho aquelas que apresentam maior atividade quando comparado com hidrolisado não fracionado (SHAZLY et al., 2017).

3.4.2 Propriedades bioativas

Os peptídeos bioativos podem apresentar diferentes atividades biológicas, tais como: atividade antioxidante, antimicrobiana, antitumoral e anti-hipertensiva (CHALAMAIAH; YU; WU, 2018; ENNAAS et al., 2015; LEE; HUR, 2017; SILA; BOUGATEF, 2016).

3.4.2.1 Propriedade antioxidante

A oxidação lipídica é uma reação de deterioração que representa um grande problema tanto para indústria de alimentos como para os consumidores, uma vez que essa reação pode causar alterações nos alimentos, provocando riscos à saúde quando ingeridos (SILA; BOUGATEF, 2016).

Os antioxidantes são definidos como substâncias que são capazes de atrasar, controlar ou inibir a oxidação lipídica de maneira eficaz, através do bloqueio do efeito danoso dos radicais livres (NIKOO; BENJAKUL, 2015). Os radicais livres são moléculas formadas durante o processo metabólico que atacam diferentes macromoléculas no organismo, causando danos oxidativos em células ou tecidos ou mesmo resultando em mutação genética. Em condições normais, os radicais livres são eliminados de forma eficaz pelos sistemas antioxidantes endógenos. No entanto, quando existe um excesso de radicais livres no organismo, pode ocorrer um estresse oxidativo que resulta em danos celulares que podem desencadear desenvolvimento de doenças incluindo arteriosclerose, doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas, câncer e distúrbios do envelhecimento (CAI et al., 2015).

Os antioxidantes podem ser classificados de acordo com a sua atuação sobre a reação de oxidação. Os antioxidantes primários são aqueles que neutralizam os radicais livres ao doar um átomo de hidrogênio ou um elétron a radicais livres. Enquanto que antioxidantes secundários são aqueles que neutralizam catalisadores pro-oxidantes, desativando as espécies reativas como o oxigênio singlet ou através da inativação de metais catalisadores (SHAHIDI, 2015).

Para prevenir as reações oxidativas em alimentos, muitos antioxidantes sintéticos são utilizados, tais como butil hidroxianisol (BHA), butil hidroxitolueno (BHT), butil hidroxiquinona (TBHQ) uma vez que são capazes de capturar os radicais livres e controlar os processos oxidativos (NIKOO; BENJAKUL, 2015). No entanto, os antioxidantes sintéticos estão perdendo espaço para os antioxidantes naturais, devido à sua toxicidade e aos efeitos cancerígenos apresentados por alguns compostos.

Peptídeos obtidos através da hidrólise enzimática de proteínas de origem marinha são destacados como importantes antioxidantes naturais (ABDELHEDI et al., 2016; ALEMÁN et al., 2011; CAI et al., 2015; CENTENARO et al., 2014; HARNEDY; FITZGERALD, 2012; JEMIL et al., 2017; NGO; RYU; KIM, 2014; RAJAPAKSE et al., 2005; SALEM et al., 2017; ZAVAREZE et al., 2014). Os peptídeos marinhos com capacidade antioxidante são caracterizados como uma mistura de aminoácidos de cadeia curta (3 a 16 aminoácidos) com massa molecular variando de 200 a 1800 Da (JIANG et al., 2014). Jang, Liceaga e Yoon (2016) hidrolisaram proteínas de pescado usando Alcalase e isolaram e purificaram um peptídeo com massa molecular aproximado a 500 Da e na sequência peptídica purificada foram encontrados os aminoácidos alanina, treonina, serina e histidina.

A composição aminoacídica desses peptídeos também é reportada como fator de influência sobre a bioatividade, como a presença de peptídeos polares e hidrofóbicos, geralmente constituídos por ácido aspártico, ácido glutâmico, glicina, alanina, leucina, histidina, prolina, tirosina, fenilalanina e lisina. No entanto, a contribuição específica de resíduos individuais de aminoácidos para a atividade antioxidante de um peptídeo depende em grande parte dos radicais livres e do meio de reação (ISHAK; SARBON, 2018; UDENIGWE; ALUKO, 2012).

De acordo com Chi et al. (2014), os peptídeos de menor massa molecular correspondem aos de maior poder antioxidante e são considerados excelentes doadores de elétrons, com a capacidade de reação com os radicais livres, tornando-os compostos estáveis. Centenaro et al. (2014) sugeriram que a presença de aminoácidos hidrofóbicos e sulfurados conferem uma maior atividade antioxidante.

A capacidade antioxidante dos hidrolisados e peptídeos marinhos pode ser classificada em dois grupos de acordo com o tipo de reação em que eles atuam, seja pela atuação em métodos baseados na transferência de hidrogênio ou elétrons. Os ensaios baseados na transferência de hidrogênio avaliam a capacidade de um peptídeo em reduzir os radicais livres. Entre esses ensaios estão o sistema de β-caroteno e a capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC) (HUANG; BOXIN; PRIOR, 2005; TOLDRÁ et al., 2017). Entretanto os métodos que possuem o fundamento na transferência de elétrons, são os mais utilizados em diversas pesquisas que estudam o poder antioxidante de hidrolisados e peptídeos marinhos (CENTENARO; MELLADO; PRENTICE-HERNÁNDEZ, 2011; FARVIN et al., 2014; ZHANG; WANG; XU, 2008).

Esses métodos avaliam a capacidade do composto para transferir um elétron para reduzir um agente oxidante. Geralmente, os métodos de maior utilização são o de captura do radical ABTS (ácido-2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico), captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrizil-hidrazil) e poder redutor (HUANG; BOXIN; PRIOR, 2005; TOLDRÁ et al., 2017). O método de captura do radical ABTS é baseado na capacidade dos antioxidantes de capturar o cátion radical $ABTS^{\cdot+}$. Esta captura produz um decréscimo na absorbância a 734 nm. O método de DPPH é baseado na captura do radical DPPH por antioxidantes, produzindo um decréscimo da absorbância a 515 nm (GRANATO; NUNES, 2016). Enquanto que o poder redutor avalia a capacidade dos agente antioxidantes em reduzir o Fe^{3+} para Fe^{2+}, fazendo com que ocorra a mudança da coloração da solução original a 700 nm (ZHANG; WANG; XU, 2008). De acordo com pesquisadores é necessário dois ou mais métodos de análise para atestar a atividade antioxidante dos hidrolisados e peptídeos bioativos (CENTENARO; MELLADO; PRENTICE-HERNÁNDEZ, 2011; VILLAMIL; VÁQUIRO; SOLANILLA, 2017).

3.4.2.2 Propriedade antimicrobiana

A contaminação de alimentos por bactérias patogênicas durante o processamento é um problema de saúde pública mundial (HATAB et al., 2017). Um amplo espectro de peptídeos antimicrobianos (PAMs) vem sendo estudado para prevenir ou reduzir esse tipo de contaminação na indústria de alimentos (MIRHOSSEINI; AFZALI, 2016). Além disso, os PAMs podem ser utilizados no desenvolvimento de antibióticos como agentes antibacterianos (ALMATAR et al., 2017).

Neste âmbito, os PAMs derivados de pescado são considerados promissores contra inúmeras bactérias, podendo ser utilizados tanto na indústria alimentícia durante o

processamento de alimentos, bem como na indústria farmacêutica como antibióticos (JEMIL et al., 2016). Os PAMs produzidos a partir de proteínas de pescado demonstraram propriedades inibidoras de crescimento para uma série de bactérias, incluindo *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Enterococcus sp., Micrococcus luteus, Bacillus cereus, Klebsiella pneumoniae e Listeria monocytogenes,* entre outras (BEAULIEU et al., 2013; ROBERT et al., 2015; SILA et al., 2014a; TANG et al., 2015; WALD et al., 2016).

Ennaas et al. (2015) hidrolisaram os subprodutos de cavala do atlântico utilizando diferentes proteases comerciais (neutrase, protamex, papaína e flavourzyme). Os autores verificaram que os hidrolisados obtidos apresentaram inibição de 40% frente a *Listeria innocua e Escherichia coli.* Kuppusamy e Ulagesan (2016) investigaram a atividade antimicrobiana do hidrolisado proteico de moluscos marinhos obtidos via hidrólise enzimática utilizando tripsina. O ensaio antibacteriano foi realizado frente a quatro agentes patogênicos (*Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Proteus vulgaris, Hafniaalvei)* através do método de difusão em ágar. Os resultados encontrados indicaram uma zona máxima de inibição para *Staphylococcus aureus de* 22,16 ± 1,04 mm na concentração de 1000 μg / ml de hidrolisado. De acordo com Balouiri, Sadiki e Ibnsouda (2016), o método de difusão em ágar pode ser utilizado para verificar a capacidade de inibição dos compostos antimicrobianos contra diferentes microrganismos. Nesse método, discos contendo o composto inibidor são inseridos em placas contendo ágar e o micro-organismo. Em seguida, essas placas são incubadas em temperatura adequada, e após 24 horas é verificado o poder de inibição contra o crescimento dos micro-organismos testados.

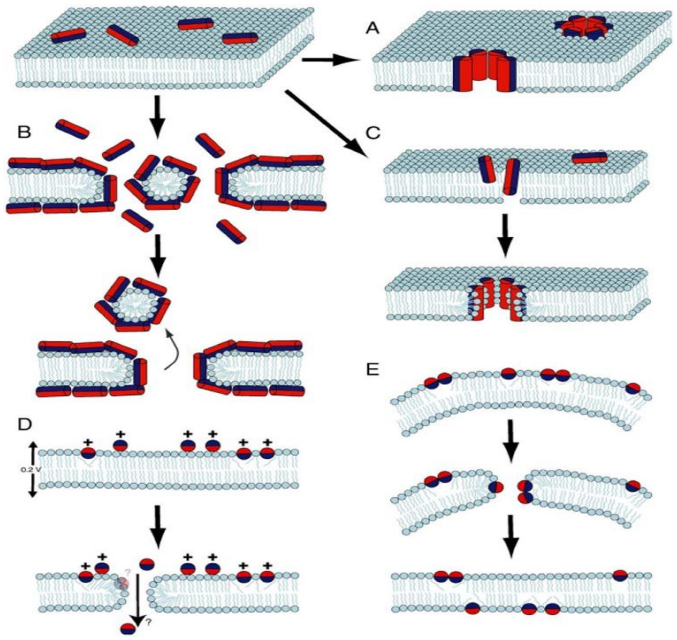
Os PAMs provenientes de pescado geralmente são produzidos via hidrólise enzimática utilizando proteases de origem microbiana, são compostos por até 50 resíduos de aminoácidos, na sua grande maioria de caráter hidrofóbico, com massa molecular < 10 kDa e carga líquida positiva (SAADI et al., 2015a).

O efeito antimicrobiano dos PAMs está relacionado com a capacidade dos compostos em interagir com as membranas bacterianas, inibindo o crescimento dos micro-organismos através do rompimento das membranas, interferência no metabolismo ou ataque aos componentes celulares (TRAVKOVA; MOEHWALD; BREZESINSKI, 2017). A Figura 5 apresenta os diferentes mecanismos de interação com a membrana celular bacteriana utilizados pelos PAMs

No modelo *"barrel steve"* (Figura 5A) os peptídeos interagem com a membrana bacteriana, de maneira que a região hidrofóbica do peptídeo interaja com os lipídeos da membrana e as regiões hidrofílicas do peptídeo formem um poro em formato de barril. No

modelo “tapete” (Figura 5B) ocorre o alinhamento dos peptídeos de forma paralela à superfície da membrana, formando um tapete peptídico. O modelo de *“poro toroidal”* (Figura 5C) é semelhante ao *“barrel steve”* onde ocorre a formação de poros perpendiculares, contendo peptídeos intercalados com moléculas lipídicas da membrana. No modelo de *“eletroporação molecular”* (Figura 5D), os peptídeos catiônicos se associam com a membrana bacteriana, gerando uma diferença de potencial elétrico através da membrana. Quando a diferença de potencial atinge um determinado limite, um poro é formado por eletroporação molecular. No modelo *“sinking-raft”* (Figura 5E), os peptídeos interagem com a membrana devido a sua característica anfipática, provocando um desequilíbrio de massa, resultando no aumento da curvatura da membrana permitindo que o peptídeos se insiram na membrana formando poros transientes (CHAN; PRENNER; VOGEL, 2006).

Figura 5 - Mecanismos utilizados pelos PAMs para interação com a membrana celular: (A) “Barrel steve” (B) “Tapete” (C) “Poro toroidal” (D) “Eletroporação molecular” (E) “Sinking-raft”. Regiões vermelhas representam superfície hidrofílica, enquanto que as regiões azuis são hidrofóbicas.



Fonte: Chan, Prenner e Vogel (2006)

A hidrofobia, a massa molecular e a proporção de grupos polares desempenham um papel importante determinando a atividade antimicrobiana dos peptídeos (GOBBETTI; MINERVINI; RIZZELLO, 2004; GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2010). Os PAMs apresentam regiões hidrofóbicas e hidrofílicas, conferindo uma característica anfipática, fundamental para se ligarem e interagirem com a membrana microbiana (EBENHAN et al., 2014; HANCOCK;

G. DIAMOND, 2000). Jemil et al. (2016) verificaram o poder de inibição de diferentes frações peptídicas de sardinha (*Sardinella saudita*) contra nove bactérias (*Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae, Salmonella enterica, Salmonella typhi, Enterobacter sp., Staphylococcus aureus, Bacillus cereus e Micrococcus luteus*). As frações peptídicas de maior atividade, foram sequenciadas e apresentaram elevado teor de aminoácidos hidrofóbicos. Os autores acreditam que o caráter hidrofóbico colabora para o aumento da bioatividade antimicrobiana, uma vez que facilita a penetração dos peptídeos na membrana bacteriana.

3.4.2.3 Propriedade Antitumoral

O câncer é uma das principais causas de morbidade e mortalidade a nível mundial, sendo responsável por 8,8 milhões de mortes no ano de 2015. Globalmente, a cada seis mortes, uma é devido ao câncer (WHO, 2018). O processo de carcinogênese inicia-se pelo crescimento anormal e proliferação de células cancerosas pelos tecidos devido a mutações genéticas sofridas no gene das células, durante o processo de divisão celular (INCA, 2018).

Os tumores malignos, também reconhecidos como câncer, geralmente são tratados com fármacos sintéticos através de sessões de quimioterapia. Entretanto, estudos relatam a quimioterapia como um tratamento causador de muitos efeitos colaterais e danos irreversíveis à células não cancerosas (CHALAMAIAH; YU; WU, 2018; PAN et al., 2016).

Nesse sentido, diversos pesquisadores têm focado as suas pesquisas na obtenção de agentes antitumorais a partir de diferentes fontes naturais, como hidrolisados proteicos de pescado. Hsu, Li-chan e Jao (2011) estudaram a atividade antitumoral de hidrolisados proteicos de atum frente a uma linhagem celular de câncer de mama (MCF-7). No estudo, os hidrolisados foram avaliados como agentes antitumorais através do ensaio de MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]}, e as amostras de maior poder inibitório foram fracionadas e sequenciadas. Os resultados encontrados sugeriram que as frações peptídicas (Leu-Pro-His-Val-Leu-Thr-Pro-Glu-Ala-Gly-Ala-Thr e Pro-Thr-Ala- Glu-Gli-Gli-Val-Tyr-Met-Val-Thr) de maior efeito apresentaram atividade antiproliferação dose dependente em células com IC 50 de 8,1 e 8,8 μM. Song et al. (2015) identificaram um peptídeo com efeito inibidor do crescimento de uma linhagem celular de câncer de próstata. O peptídeo foi obtido a partir da hidrólise proteica de anchova (*Setipinna taty*) e apresentou baixa massa molecular e elevado caráter hidrofóbico. Picot et al. (2006) relataram a atividade antiproliferativa de dezoito hidrolisados proteicos de diferentes espécies marinhas, e verificaram que o hidrolisado obtido

a partir de proteínas do bacalhau pela ação das enzimas alcalase e protamex demonstraram maior efeito inibitório frente a linhagem celular de câncer de mama (MCF-7).

A sequência peptídica, caráter hidrofóbico e o tamanho são características que influenciam na atividade antitumoral dos peptídeos (HUNG et al., 2014). Os peptídeos de baixa massa molecular são reportados como importantes agentes antitumorais uma vez que possuem maior mobilidade molecular e difusividade, melhorando as interações com os componentes das células cancerosas (KIM et al., 2013; MA et al., 2015; WANG et al., 2018). Para Wang et al. (2008) os aminoácidos hidrofóbicos dos peptídeos facilita a interação com a membrana celular das células cancerosas, uma vez que esse tipo de célula apresenta altos teores de fosfolipídios quando comparados com as células normais.

Os mecanismos de ação dos peptídeos antitumorais são parcialmente descritos na literatura, sabe-se que o alvo de ligação é a membrana celular, e que após a ligação eles podem desencadear uma série de reações levando a morte celular e a inibição da angiogênese tumoral. A angiogênese é o processo em que novos vasos sanguíneos são formados durante o desenvolvimento do tumor, sendo fundamental para o seu crescimento e para demais células cancerosas espalhadas pelo corpo. Entre os mecanismos de ação estão: inibição da migração celular, inibição da angiogênese tumoral, mecanismos antioxidativos, inibição da transcrição genética ou proliferação celular, indução de apoptose, citoxicidade, entre outros (BLANCO-MÍGUEZ et al., 2016).

A proliferação celular nas células não cancerosas é um fenômeno natural que controla o funcionamento do organismo, mantendo um equilíbrio adequado entre o número de células mortas (por morte celular programada, doenças ou lesões) e a proliferação de novas células. Entretanto, uma proliferação celular descontrolada, devido a mutações no código genético, pode induzir um crescimento celular inadequado e até mesmo o câncer. Nesse sentido, pensa-se que os métodos que avaliam a proliferação celular de células cancerosas são considerados os mais eficazes para o tratamento de tumores (CHI et al., 2015).

Os efeitos antitumorais dos peptídeos geralmente são investigados através da avaliação da citotoxicidade desses compostos frente as linhagens celulares cancerosas e não cancerosas. Entre os testes utilizados, o método colorimétrico do MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]} é o mais utilizado para avaliar a viabilidade celular através da atividade mitocondrial desidrogenase. Nesse teste, as enzimas mitocondriais catalisam a redução do substrato MTT, produzindo formazan, o qual é um produto de coloração azulada. A quantificação de formazan é realizada a 570 nm e está diretamente relacionada a viabilidade celular (CHALAMAIAH; YU; WU, 2018; MOSMANN, 1983).

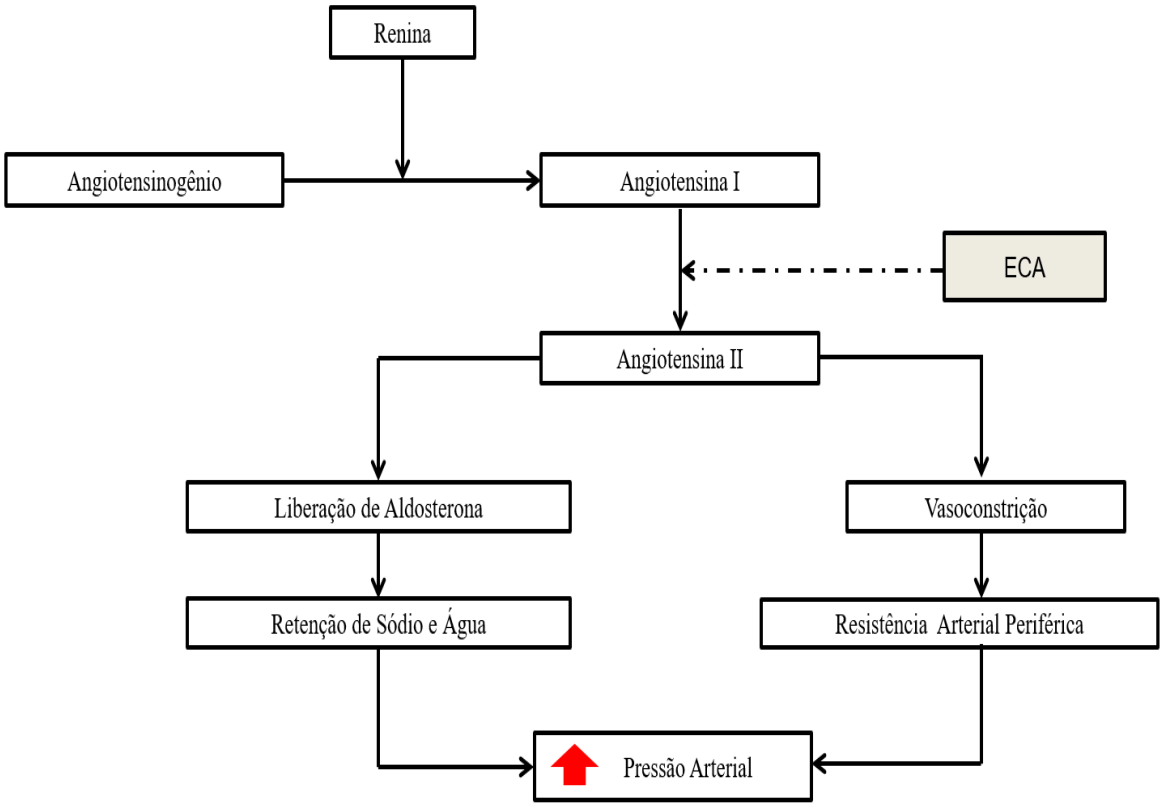
3.4.2.4 Propriedade anti-hipertensiva

A hipertensão arterial (HA) é um problema de saúde pública caracterizado pela elevação da pressão sanguínea do organismo que afeta a população a nível mundial e constitui um importante fator de risco para doenças cardiovasculares (GONÇALVES, 2011). Essa patologia desenvolve-se a partir de uma complexa interação de fatores genéticos, ambientais e muitos outros fatores, como aumento da atividade do sistema nervoso simpático, aumento dos níveis de consumo do teor de sódio, ingestão diária inadequada de potássio e cálcio (FOEX; SEAR, 2004; HALL et al., 2012; SARZANI et al., 2008).

O sistema renina-angiotensina-aldosterona é considerado como um dos principais sistemas de regulação da pressão arterial. A Figura 6 apresenta um esquema de ação desse sistema, onde ele é ativado através da liberação da enzima renina proveniente das células justaglobulares dos rins, e ocorre quando o organismo está sob hipotensão. A enzima renina na corrente sanguínea cliva o seu substrato o angiotensinogênio produzindo um decapeptídeo angiotensina I. A angiotensina I migra pela circulação e interage com a enzima conversora de angiotensina (ECA), clivando o seu dipeptídeo terminal (His-Leu), resultando na produção de angiotensina II, um importante vasoconstritor. Além de aumentar a resistência periférica, a angiotensina II circula pela corrente sanguínea e vai para os rins e estimula a síntese do hormônio aldosterona, o qual diminui a excreção de sódio e água pelos rins, fazendo com que a pressão arterial aumente. Além disso, a ECA também é responsável pela degradação de um importante vasodilatador, a bradicinina (GUYTON; HALL, 2011; INGAMI, 1994; LEE; HUR, 2017; WU; LIAO; UDENIGWE, 2017).

O tratamento da HA geralmente é realizado através de fármacos sintéticos inibidores da ECA, uma vez que essa enzima é responsável pela tensão arterial. Entretanto, os fármacos sintéticos utilizados para reduzir a pressão arterial são apontados como causadores de efeitos adversos ao organismo como tosse, aumento dos níveis de potássio no sangue, baixa pressão sanguínea, erupções cutâneas, dores de cabeça, fadiga (LEE; HUR, 2017). Nesse sentido, estudos buscam fontes alternativas para obtenção de agentes anti-hipertensivos. Os peptídeos do pescado estão sendo considerados importantes agentes anti-hipertensivos uma vez que possuem elevada capacidade de inibição da enzima ECA (ABDELHEDI et al., 2016; ALEMÁN et al., 2011; AMBIGAIPALAN; SHAHIDI, 2017; NEVES et al., 2017; NGO; RYU; KIM, 2014; SLIZYTE et al., 2016).

Figura 6 - Sistema renina-angiotensina-aldosterona para regulação da pressão arterial



Fonte: Guyton e Hall(2011) (adaptado)

Slizyte et al. (2016) hidrolisaram proteínas de salmão utilizando nove combinações de enzimas comerciais. Todas as amostras apresentaram efeito inibitório sobre ECA dependente do tipo de enzima utilizado na hidrólise. Os autores também observaram uma correlação entre o tempo de hidrólise e a atividade de inibição. Os hidrolisados com maior tempo de hidrólise apresentaram menor massa molecular e consequentemente maior atividade anti-hipertensiva. Entre as amostras, os hidrolisados obtidos com a enzima tripsina e tempo de reação de 120 minutos foram os mais efetivos frente a inibição da ECA.

Ngo et al. (2016) obtiveram peptídeos anti-hipertensivos a partir de subprodutos de bacalhau. Inicialmente os autores realizaram a hidrólise da fração proteica com várias enzimas (pepsina, papaína, α-quimotripsina, tripsina, neutrase e alcalase). E a amostra que apresentou maior inibição frente a ECA foi fracionada mediante membranas de ultrafiltração em diferentes faixas (<1, 1-5, 5-10 e >10 kDa). E os resultados obtidos pelos autores mostraram que a amostras de menor massa molecular foram as de maior efeito anti-hipertensivo.

O efeito anti-hipertensivo dos peptídeos de pescado está relacionado com o grau de extensão da hidrólise e a sua composição aminoacídica, apesar de não existir um mecanismo

exato de atuação (HERNANDEZ-LEDESMA; CHIA-CHIEN, 2013). Ishak e Sarbon (2018) relatam que a baixa massa molecular permite que os peptídeos anti-hipertensivos sejam facilmente absorvidos nas membranas plasmáticas celulares aumentando assim a biodisponibilidade.

De acordo com Gonçalves (2011) existe uma relação entre a estrutura do peptídeo e a sua capacidade de inibir ECA. O autor afirma que o centro ativo da ECA interage preferencialmente com os peptídeos que possuem no terminal C resíduos hidrófobos, como a fenilalanina, a tirosina e o triptofano, isoleucina, valina e prolina. O mesmo autor ainda relata que a presença dos aminoácidos lisina ou arginina parecem contribuir para o efeito anti-hipertensivo. Da mesma forma, em seu estudo afirma que a capacidade de inibição dos peptídeos é potencializada quando os mesmos contem aminoácidos polares e hidrofóbicos, incluindo triptofano, fenilalanina, tirosina e prolina no terminal C e valina no terminal N (MAHMOODANI et al., 2014).

3.5 ENCAPSULAÇÃO DE COMPOSTOS ATIVOS

3.5.1 Generalidades

A encapsulação é um processo que tem por finalidade a proteção dos compostos bioativos através do seu empacotamento dentro de um ou mais materiais poliméricos (EZHILARASI et al., 2013). O material encapsulado é denominado de núcleo ou carga útil, enquanto que o material que envolve o núcleo pode receber diferentes denominações como material de parede, agente encapsulante, matriz envoltória ou cobertura (AZEREDO et al., 2005; FANG; BHANDARI, 2010). As cápsulas produzidas podem ser classificadas em três escalas: macro (> 5000 μm), micro (0,2 - 5000μm) e nanocápsulas (< 0,2μm) (AZEREDO et al., 2005; BAKER, 1986).

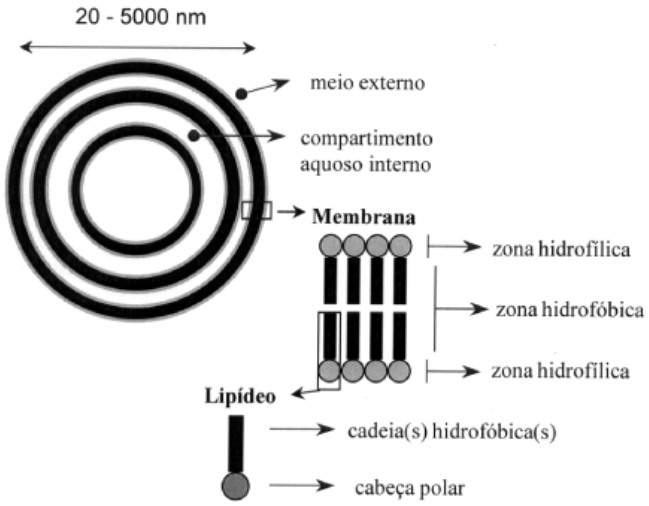
Os processos de encapsulação garantem maior estabilidade aos compostos bioativos protegendo-os das reações adversas do meio como barreira efetiva (RAY; RAYCHAUDHURI; CHAKRABORTY, 2016). Dentre as técnicas de encapsulação desenvolvidas para proteção de compostos ativos estão os métodos de secagem por atomização, liofilização, coacervação, emulsificação, nanopreciptação e lipossomas (JAFARI, 2017). Dentre esses, os lipossomas ocupam lugar de destaque na proteção de compostos bioativos provenientes de pescado

(HOSSEINI; RAMEZANZADE; NIKKHAH, 2017; MOSQUERA et al., 2014, 2016; ZAVAREZE et al., 2014).

3.5.2 Encapsulação por lipossomas

Lipossomas são vesículas esféricas compostas por camadas lipídicas e um compartimento aquoso, conforme apresentado na Figura 7 (FATHI; MOZAFARI; MOHEBBI, 2012).

Figura 7 - Estrutura do lipossoma



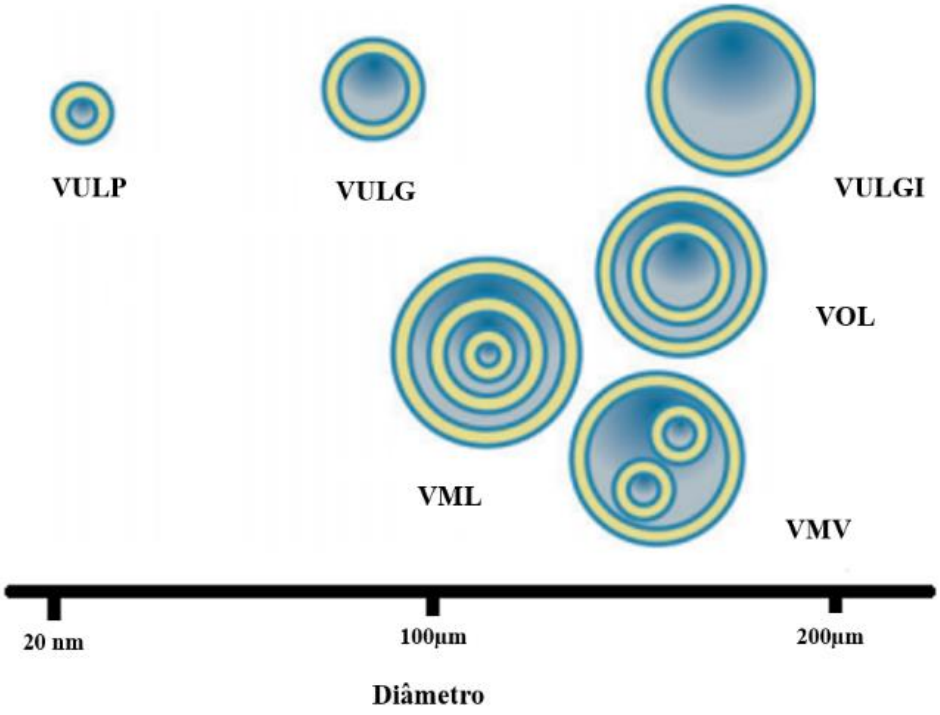
Fonte: Frézard et al. (2005)

O mecanismo de formação de lipossomas baseia-se em interações desfavoráveis entre os compostos anfifílicos (principalmente fosfolipídios) e as moléculas de água, onde os grupos polares dos fosfolipídios são submetidos às fases aquosas dos meios internos e externos e as caudas de hidrocarbonetos hidrofóbicos ficam associadas as estruturas bicamadas, e assim a estrutura esférica do núcleo é formada (GOYAL et al., 2005; JESORKA; ORWAR, 2008).

Os lipossomas podem ser classificados de acordo com seu número de bicamadas de membranas e tamanho, conforme apresentado na Figura 8. De acordo com a sua estrutura bicamada, as vesículas podem ser classificadas como pequenas, grandes ou gigantes. As que apresentam uma ou mais camadas são denominadas como vesículas unilamelares (VUL) ou vesículas multilamelares (VML), e a transformação induzida de VUL em VML originam as vesículas oligolamelares (VOL). Outro tipo também conhecido são as vesículas

multivesiculares (VMV) são aquelas que apresentam pequenas vesículas não concêntricas presas dentro de uma única bicamada lipídica (FATHI; MOZAFARI; MOHEBBI, 2012; JESORKA; ORWAR, 2008).

Figura 8 - Representação do esquema de classificação aplicado para lipossomas: (VULP) vesículas unilamelares pequenas, (VULG) vesículas unilamelares grandes (VULGI) vesículas unilamelares gigantes, (VOL) vesículas oligomelares, (VML) vesículas multimelares, (VMV) vesículas multivesiculares



Fonte: Jesorka e Orwar (2008) adaptado

Diferentes métodos podem ser utilizados para produção de lipossomas, entre eles encontra-se o método conhecido como hidratação do filme lipídico. Nesse método, inicialmente os lipídeos são dissolvidos em um solvente orgânico para obter uma mistura homogênea. Essa mistura é levada ao aquecimento para evaporação do solvente e consequentemente formação do filme lipídico. Um meio aquoso contendo o composto ativo então é adicionado a esse filme, após 18 h de evaporação do solvente em dessecador com proteção da luz. Então, essa mistura é submetida a ciclos de sonicação, aquecimento e descanso para formação das micelas lipídicas contendo o composto ativo (MAYER; HOPE; CULLIS, 1986; ZOGHI; KHOSRAVI-DARANI; OMRI, 2016). As fontes lipídicas geralmente utilizadas para produção dos lipossomas são a lecitina de soja ou ovo. Zavareze et al. (2014) produziram cápsulas proteicas de corvina mediante encapsulação por lipossomas utilizando o método de hidratação do filme

lipídico. No estudo, foi possível verificar que a técnica empregada na encapsulação foi eficaz para produzir cápsulas estáveis e com baixa dispersão. Além disso, foi possível constatar a eficiência da técnica na proteção da bioatividade antioxidante dos compostos. No mesmo sentido, outros estudos já demonstraram que a encapsulação por lipossomas melhora a estabilidade química e mantém a bioatividade dos peptídeos (CARMONA-RIBEIRO; CARRASCO, 2014; MALHEIROS et al., 2010; MALHEIROS; DAROIT; BRANDELLI, 2010; HOSSEINI; RAMEZANZADE; NIKKHAH, 2017; MOSQUERA et al., 2014, 2016).

A encapsulação de peptídeos biologicamente ativos mediante lipossomas vêm sendo abordada constantemente em pesquisas tecnológicas, e apresenta-se como a de maior interesse por apresentar diversas vantagens, por exemplo, produção em grande escala, utilização de fontes naturais para fonte lipídica e a capacidade de encapsular compostos ativos de caráter hidrofóbico e hidrofílico (MOHAN et al., 2015). Segundo Allen e Cullis (2013) a encapsulação mediante lipossomas é o método particularmente mais adequado para o encapsulamento de peptídeos bioativos porque eles contêm regiões polares, apolares e anfifílicas dentro da mesma partícula coloidal. Da mesma forma Yokota, Moraes e Pinho (2012) acreditam que a técnica de encapsulação por lipossomas seja a mais indicada para o encapsulação de peptídeos bioativos, uma vez que o material de parede utilizado assemelha-se às membranas celulares.

CAPÍTULO III

DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

APRESENTAÇÃO

As atividades da tese foram, em geral, desenvolvidas junto ao Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA) pertencente a Escola de Química e Alimentos (EQA) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG). Os ensaios para avaliação da bioatividade antitumoral foram desenvolvidos no Laboratório de Cultura Celular do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da mesma universidade. A determinação da composição aminoacídica dos hidrolisados proteicos foi realizada através do laboratório terceirizado C.B.O. ANÁLISES LABORATORIAIS LTDA.-EPP em Vale Verde - Valinhos – SP. A presente tese foi dividida em quatro artigos científicos intitulados como:

ARTIGO I: Propriedades funcionais e antioxidantes de hidrolisados proteicos de camarão branco *(Litopenaeus vannamei)*;

ARTIGO II: Efeitos antimicrobiano e antitumoral apresentado por hidrolisados proteicos de camarão branco *(Litopenaeus vannamei)*;

ARTIGO III: Atividade antioxidante e anti-hipertensiva apresentada por peptídeos de camarão branco *(Litopenaeus vannamei);*

ARTIGO IV: Nanoencapsulação por lipossomas de frações peptídicas de camarão branco *(Litopenaeus vannamei).*

ARTIGO I

PROPRIEDADES FUNCIONAIS E ANTIOXIDANTES DE HIDROLISADOS PROTEICOS DE CAMARÃO BRANCO (*Litopenaeus vannamei*)

LATORRES, J. M.; RIOS, D.G.; SAGGIOMO, G.; WASIELESKY, W. Jr.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Functional and antioxidant properties of protein hydrolysates obtained from White shrimp *(Litopenaeus vannamei)*. **Journal of Food Science and Technology**, v. 55(2), p. 721–729, 2018

RESUMO

Hidrolisados proteicos de camarão branco *(Litopenaeus vannamei)* com diferentes graus de hidrólise (GH - 10 e 20%) foram obtidos a partir da hidrólise enzimática das proteínas do músculo deste crustáceo, utilizando as enzimas Alcalase e Protamex. Os hidrolisados foram avaliados quanto a sua composição de aminoácidos, solubilidade, propriedades de espuma, atividade emulsificante e antioxidante. Todos os hidrolisados apresentaram altas concentrações de ácido glutâmico, ácido aspártico, arginina, glicina, lisina e prolina. Verificou-se um aumento na concentração de aminoácidos carregados negativamente com o acréscimo do GH de 10 a 20%. Os aminoácidos hidrofóbicos foram maiores em hidrolisados obtidos com Alcalase (GH -10%) e Protamex (GH - 20%). Os resultados indicaram que um maior grau de hidrólise apresentou uma relação positiva com a solubilidade proteica dos hidrolisados testados, enquanto que influenciou negativamente as propriedades de espuma e a emulsificação. As propriedades antioxidantes apresentadas pelos hidrolisados proteicos de camarão branco foram influenciadas pela composição e tamanho da cadeia. Os hidrolisados proteicos com maior grau de hidrólise apresentaram maior capacidade de sequestro do radical DPPH (2,2–difenil–1–picrilhidrazila) e maior poder redutor, enquanto que hidrolisados com menor grau de hidrólise apresentaram maior capacidade de captura do radical ABTS (2,2´-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico). Todos os hidrolisados apresentaram atividade antioxidante dependente da concentração. Portanto, os resultados do presente estudo sugerem que os hidrolisados proteicos de camarão branco surgem como compostos que podem ser utilizados como aditivos bioativos para uso na formulação de alimentos funcionais, bem como antioxidantes naturais em sistemas alimentares lipídicos.

Palavras-chave: Hidrólise. Funcionalidade. Bioatividade. Camarão.

1 INTRODUÇÃO

A aquicultura vem destacando-se como uma alternativa sustentável, capaz de suprir em 50% as necessidades globais de pescados e frutos do mar, uma vez que as demandas por proteínas marinhas superam a produção sustentável dos oceanos (FAO, 2014). Entre as práticas aquícolas, a espécie de maior cultivo é o camarão branco *(Litopenaeus vannamei)* O cultivo dessa espécie intensificou-se através do uso de sistemas sem trocas de água, denominados como sistema de bioflocos. Este sistema contem flocos microbianos e resulta uma melhor qualidade da água, uma vez que reduz a concentração de nitrogênio e possibilita a conversão de amônia em proteínas celulares, servindo também como uma fonte suplementar de nutrição para as espécies cultivadas (SOUZA et al., 2016).

O camarão branco é um dos crustáceos mais populares e de baixo valor calórico, que apresenta em sua composição um elevado teor de ferro, cálcio, vitaminas e sais minerais (GUNASEKARAN et al., 2015). E quando cultivado pelo sistema de bioflocos apresenta uma composição diferenciada, em teores proteicos (MARTINI; NURSYAM; FADJAR, 2015). Diferentes pesquisadores, tem concentrado o foco de suas pesquisas no aproveitamento dos subprodutos proteicos do camarão branco, para a obtenção de hidrolisados proteicos (CHEUNG; LI-CHAN, 2014; DEY; DORA, 2014; GUNASEKARAN et al., 2015).

Hidrolisados proteicos apresentam uma variedade de aplicações, seja na indústria de alimentos ou farmacêutica (VILLAMIL; VÁQUIRO; SOLANILLA, 2017). A hidrólise proteica consiste na clivagem de moléculas de proteínas em unidades peptídicas de diferentes tamanhos, a quebra da estrutura das proteínas possibilita a modificação ou melhoramento das propriedades funcionais (LIU et al., 2014). Além das funcionalidades, os hidrolisados obtidos através do processo hidrólise enzimática de proteínas de origem marinha são destacados como importantes antioxidantes naturais (ALEMÁN et al., 2011; NGO; RYU; KIM, 2014; SHAVANDI et al., 2017). Estudos indicam que o grau de hidrólise influencia na funcionalidade e atividade antioxidante dos hidrolisados (KLOMPONG et al., 2007; LIU et al., 2014; VILLAMIL; VÁQUIRO; SOLANILLA, 2017). Nesse sentido, o objetivo do presente estudo foi produzir hidrolisados proteicos de camarão branco e estudar sua funcionalidade e atividade antioxidante.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

A matéria prima, *Litopenaeus vannamei*, foi fornecida pela Estação Marinha de Aquicultura da Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil. O camarão branco foi despescado dos tanques de cultivo e em seguida foram transportados para o Laboratório de Processamento de Pescado da Universidade Federal de Rio Grande, em caixas herméticas, submersos em flocos de gelo. O processamento teve início com a higienização da espécie em água clorada (5 ppm), seguida do processo de remoção do cefalotórax e carapaças. Então, o músculo do camarão foi triturado e armazenado em sacos de polietileno a -18 ºC. As enzimas Alcalase e Protamex foram produzidas pela Novozymes Latina Americana Ltda e Sigma Aldrich, respectivamente. ABTS (2,2´-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) e DPPH (2,2–difenil–1–picrilhidrazila) foram adquiridos pela Sigma Aldrich. Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

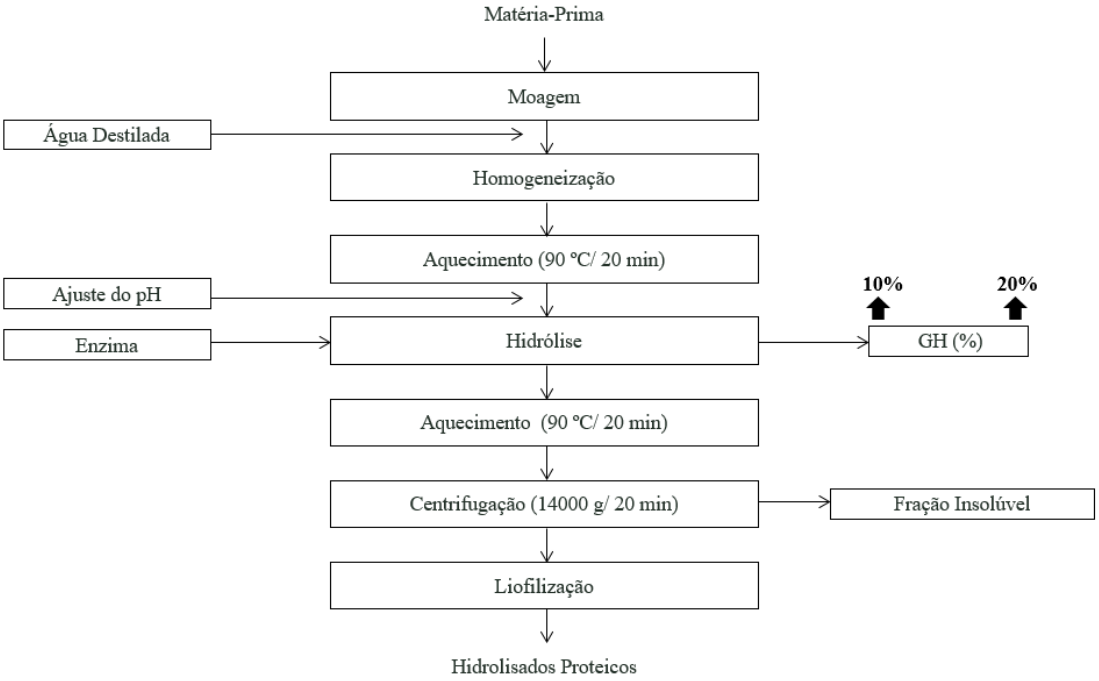
2.2 MÉTODOS

2.2.1 Obtenção de hidrolisados proteicos de camarão branco

A obtenção dos hidrolisados proteicos de camarão foi realizada a partir da hidrólise enzimática do músculo do camarão branco pela adição das proteases nas condições ótimas de pH e temperatura, conforme apresentado na Figura 1. O processo teve início a partir da moagem do músculo em *cutter*, seguida da homogeneização com água destilada na proporção 1:2 (p:v). Em seguida, a mistura foi submetida a um aquecimento em banho termostatizado a 90 ºC por 20 min para inativação das enzimas endógenas, presentes no músculo da espécie. Após inativação, a mistura foi transferida para um reator de vidro de parede dupla conectado a um banho termostatizado e, teve seu pH ajustado com NaOH, de acordo com a enzima de trabalho, Alcalase (pH 8,0, 50 ºC) e Protamex (pH 7,0, 50 ºC). Após, ajuste do pH e temperatura, a enzima foi adicionada na proporção de 1% em relação a massa de músculo e o grau de hidrólise era monitorado de acordo (ADLER-NISSEN, 1986), até que a reação atingisse de grau de hidrólise de 10 e 20%. Após a reação atingir o GH desejado, a mistura foi submetida a 90 ºC 20 min para inativação das enzimas, seguida de um processo de resfriamento à temperatura

ambiente e centrifugação a 14000 g durante 20 min a 4 ºC para separação da fração solúvel e insolúvel. A fração solúvel foi congelada e liofilizada (Liotop L108, São Carlos, Brasil) e, armazenada à - 18 ºC para posterior análises (ALEMÁN et al., 2011; LIU et al., 2014; NGO; RYU; KIM, 2014).

Figura 1 - Fluxograma do processo de obtenção dos hidrolisados proteicos de camarão branco *(Litopenaeus vannamei*)



2.2.2 Grau de Hidrólise

O grau de hidrólise (GH) foi utilizado para monitorar a reação de hidrólise, como o número de ligações peptídicas hidrolisadas em relação ao número total de ligações peptídicas da proteína, através do método de pH-sat (ADLER-NISSEN, 1986). O GH (%) foi determinado de acordo com a Equação 1.

$$GH\ (\%) = \frac{BN_B}{\alpha h_{tot}\ x\ MP} X\ 100 \qquad (1)$$

Onde: B é o volume da base consumida durante a hidrólise para manter o pH constante (mL); N_B é a normalidade da base; α é o grau de dissociação; h_{tot} é o número de

ligações peptídicas (moles equiv.kg-1) que para pescado o valor é 8,6 moles equiv.kg^{-1}; MP é a massa de proteína (g). O grau de dissociação α será calculado segundo a Equação 2.

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

Onde: pH é o pH durante a hidrólise e pK a constante de dissociação. Os valores de pK dependem da temperatura e foram calculados segundo a Equação 3.

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

Onde: T é a temperatura absoluta da hidrólise em Kelvin.

2.2.3 Composição de aminoácidos

A composição dos aminoácidos apresentada pelo hidrolisados proteicos de camarão branco foi avaliada pelo método descrito por White, Fry e Hart (1986). A análise foi realizada em cromatografia de líquida de alta eficiência pela empresa a CBO - Análises Laboratoriais.

2.2.4 Propriedades Funcionais

2.2.4.1 Solubilidade Proteica

A solubilidade proteica dos hidrolisados proteicos com diferentes GHs foi determinada para os pH 2,0; 4,0, 7,0 e 10, segundo metodologia proposta por Liu et al. (2014), com adaptações. Resumidamente, dissolveu-se 800 mg de amostra em 80 mL de água destilada e ajustou-se o pH utilizando HCl e NaOH. A solução foi agitada durante 1h a temperatura ambiente (25 ºC ± 1) ºC e em seguida centrifugou-se a 4000 rpm durante 10 min. Após o processo de centrifugação, seguiu-se para um processo de filtração para separação da fração solúvel. O teor de proteína solubilizada foi determinado de acordo com o método de Lowry et al. (1951).

2.2.4.2 Propriedades de Espuma

A capacidade de formação de espuma (FE) e as propriedades de estabilidade de espuma (EE) dos hidrolisados proteicos foram determinadas de acordo com Sathe e Salunkhe (1981), com pequenas modificações. Uma massa de 2 g de hidrolisado foi dispersa em 200 mL de água destilada. A solução foi ajustada para diferentes pH (2,0; 4,0; 7,0 e 10,0) e depois foi homogeneizada em homogeneizador Ultra-Turrax (T25, IKA WERKE) a 10000 rpm por 1 min sob temperatura ambiente de (25 ± 1) ºC. As dispersões formadas foram transferidas para uma proveta graduada de 250 mL. A capacidade de formação de espuma foi calculada como a % do aumento de volume após a agitação em relação ao volume inicial. A estabilidade da espuma formada foi obtida por repouso (20 min) da dispersão à temperatura ambiente a 25 ºC, sendo calculada a partir da Equação 4.

$$EE\ (\%) = \frac{(A-B)}{B} \times 100\ \% \quad (4)$$

Onde A é o volume após agitação (mL) e B é o volume antes da agitação (mL).

2.2.4.3 Propriedades Emulsificantes

As propriedades emulsificantes dos hidrolisados proteicos com diferentes GHs, de índice de emulsificação (IE) e estabilidade do índice de emulsificação (EIE) foram determinadas segundo método turdibimétrico Pearce e Kinsella (1978). Um volume de 120 mL, na concentração de 2 $mg.mL^{-1}$, foi homogeneizado com 40 mL de óleo de soja, em homogeneizador Ultra-Turrax (T25, IKA WERKE) a 10000 rpm durante 1 min a temperatura ambiente (25 ± 1) ºC. Após agitação o pH da solução foi ajustado para os pH 2,0; 4,0, 7,0 e 10 com o auxílio de HCl (2M) e NaOH (2M). Uma alíquota de 50 µL de solução foi diluída em 5mL de dodecil sulfato de sódio (SDS) à 0,1% (p:v). A absorbância da emulsão diluída foi mensurada a 500 nm, nos tempos de reação de 0 e 10 minutos. O índice de emulsificação (IE) e estabilidade do índice de emulsificação (EIE) foram determinados de acordo com a Equações 5 e 6.

$$IE\ (m^2/.g^{-1}) = \frac{2 \times 2{,}303 \times 100 \times A}{c \times 0{,}25 \times 10\ 000} \quad (5)$$

$$EIE\ (min) = \frac{A_0 \times 10}{A_0 - A_{10}} \quad (6)$$

Onde A é absorbância a 500 nm e c é a concentração de proteína ($g.mL^{-1}$), c é a concentração de proteína ($g.mL^{-1}$), A_0 e A_{10} são as absorbâncias das emulsões diluídas a 0 e 10 min.

2.2.5 Propriedade Antioxidante

2.2.5.1 Sequestro do radical livre DPPH

O sequestro do radical livre DPPH pelos hidrolisados com diferentes GHs foi avaliado através do método de Cheng, Moore e Yu (2006). Amostras de 500 uL de hidrolisados com diferentes concentrações (2,5; 5,0 e 7.5 $mg.mL^{-1}$), foram adicionados 500 uL de DPPH (0,1 $mmol.L^{-1}$ em 95% etanol). A mistura foi homogeneizada em *vórtex*, e mantida em repouso com ausência de luz durante 30 min. Após o repouso, a absorbância da solução foi mensurada a 517 nm. A capacidade de sequestro do radical livre DPPH foi expressa de acordo a Equação. 7.

$$\%\ \text{Sequestro do Radical DPPH} = \frac{(A_{controle} - A_{amostra})}{A_{controle}} \times 100 \quad (7)$$

Onde $A_{controle}$ é a absorbância sem amostra e $A_{amostra}$ é a absorbância com amostra.

2.2.5.2 Poder Redutor

O poder redutor dos hidrolisados proteicos foi avaliado segundo método descrito por Zhang, Wang e Xu (2008). Um volume de 250 uL de hidrolisado (2,5; 5,0 e 7,5 $mg.mL^{-1}$) foi misturado com 250 uL de tampão fosfato (0,02 $mol.L^{-1}$, pH 6,6) e 2 mL de ferricianeto de potássio (1%, p:v). A mistura foi incubada a 50 ºC por 20 min, e foram adicionados 2 mL de ácido tricloroacético (10%, p:v), seguido para uma agitação em *vórtex* de 2s. Uma alíquota 500 uL foi retirada e adicionada de 400 uL de água destilada e 100 uL de cloreto férrico (0,1%, p:v). Após 10 min de reação, foi medida absorbância da solução resultante, a 700 nm em

espectrofotômetro, sendo que um aumento na absorbância da solução indicava que houve aumento no poder redutor.

2.2.5.3 Captura do radical ABTS $^{+}$

A capacidade de captura do radical catiônico ABTS pelos hidrolisados, foi medida segundo método descrito por Chi et al. (2015). A solução contendo o radical catiônico foi preparada a partir da mistura da solução estoque ABTS (7mM) com persulfato de potássio (2,45 mM) (5 mL:88uL), mantida em repouso com ausência de luz, durante 16 h a temperatura ambiente. A solução de $ABTS^{+}$ foi diluída com etanol até atingir uma absorbância mensurada de 0,700 ± 0,05 a 734 nm. Logo após, um volume de 600 uL de solução de $ABTS^{+}$ foi misturada com 200 uL de amostra em diferentes concentrações (2,5; 5,0 e 7,5 $mg.mL^{-1}$). Após 10 minutos de repouso, a absorbância foi mensurada a 734 nm. A captura do radical ABTS $^{+}$ foi calculada de acordo com a Equação 8.

$$ABTS^{+}(\%) = \left[\frac{(A_{controle} - A_{amostra})}{A_{controle}}\right] \times 100\ \% \quad (8)$$

Onde $A_{controle}$ é a absorbância sem amostra e $A_{amostra}$ é a absorbância com amostra.

2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O tratamento dos dados foi realizado segundo software Statística 5.0, nos módulos de análise de variância (ANOVA) e teste de comparação de médias de Tukey ao nível de 5% de significância.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 COMPOSIÇÃO AMINOACÍDICA

O processo de hidrólise proteica possibilita a clivagem das proteínas em aminoácidos e peptídeos com baixa massa molecular que apresentam uma elevada qualidade

de aminoácidos podendo ser utilizados como alimentos nutracêuticos ou funcionais (CHALAMAIAH et al., 2012). As composições de aminoácidos dos hidrolisados proteicos obtidos no estudo estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Composição aminoacídica dos hidrolisados proteicos de camarão branco, com diferentes GH, preparados com as enzimas Alcalase e a Protamex

Aminoácidos (%)	**Hidrolisados**			
	A10	**A20**	**P10**	**P20**
Ácido aspártico	11,18	11,76	11,43	11,71
Ácido glutâmico	14,78	14,99	15,44	15,15
Serina	3,75	3,85	3,69	3,79
Glicina	8,20	7,74	8,57	8,40
Histidina	2,22	2,08	2,23	2,15
Arginina	10,19	9,84	10,18	9,94
Treonina	3,64	3,71	3,60	3,66
Alanina	5,64	5,67	5,93	5,82
Prolina	7,70	6,72	7,57	7,05
Tirosina	2,83	2,90	2,51	2,70
Valina	4,12	4,03	3,79	3,93
Metionina	2,32	2,38	2,23	2,33
Cisteína	1,06	1,06	0,94	1,08
Isoleucina	3,73	3,95	3,42	3,57
Leucina	6,71	6,95	6,59	6,66
Fenilalanina	3,83	4,01	3,54	3,70
Lisina	8,11	8,37	8,34	8,36
∑Hidrofóbicos	37,93	37,67	36,52	36,84
∑Positivamente carregados	20,52	20,29	20,75	20,46
∑Negativamente carregados	25,96	26,74	26,88	26,85

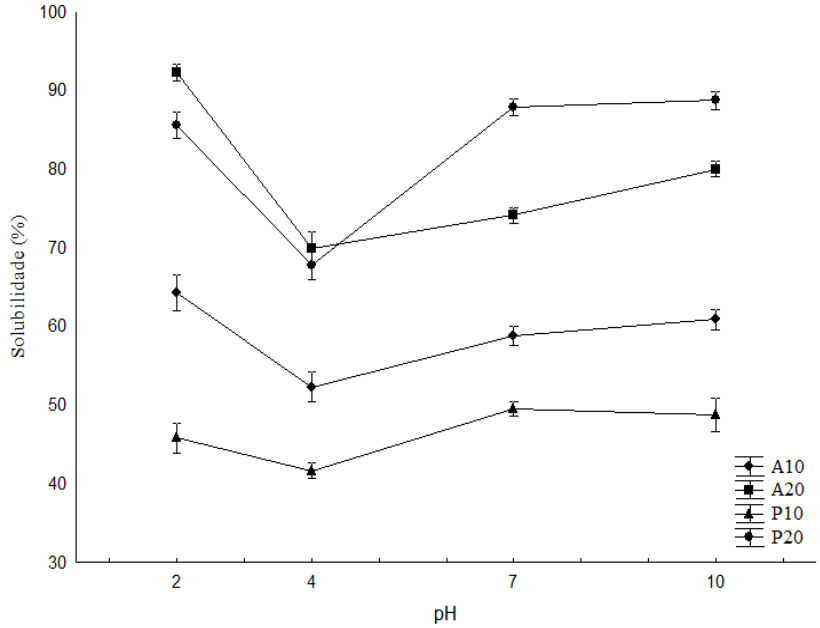
A10: Hidrolisados proteicos de camarão com GH de 10% utilizando Alcalase; A20: Hidrolisados proteicos de camarão com GH de 20% utilizando Alcalase; P10: Hidrolisados proteicos de camarão com GH de 10% utilizando Protamex; P20: Hidrolisados proteicos de camarão com GH de 20% utilizando Protamex; ∑Hidrofóbicos: Somatório de aminoácidos hidrofóbicos (alanina, cisteina, fenilalalina, isoleucina, leucina, metionina, prolina, tirosina, valina); ∑Positivamente carregados: Somatório de aminoácidos positivamente carregados (histidina, arginina e lisina); ∑Negativamente carregados: Somatório de aminoácidos negativamente carregados (ácido aspártico e ácido glutâmico).

3.2 PROPRIEDADES FUNCIONAIS DOS HIDROLISADOS

3.2.1 Solubilidade

A Figura 2 apresenta a solubilidade proteica (%) dos hidrolisados proteicos de camarão obtidos através das enzimas Alcalase e Protamex com GH de 10 e 20%. Os valores mínimos de solubilidade foram apresentados no pH 4,0 e valores máximos no pH 2. A variação na solubilidade proteica pode ser atribuída à carga líquida dos resíduos dos aminoácidos após o processo de hidrólise, que aumenta à medida que o pH se afasta do ponto isoelétrico, promovendo a agregação das interações hidrofóbicas (TAHERI et al., 2013).

Figura 2 - Solubilidade proteica de hidrolisados proteicos de camarão com diferentes GH, preparados com a Alcalase e a Protamex



A10: Hidrolisados proteicos de camarão com GH de 10% utilizando Alcalase; A20: Hidrolisados proteicos de camarão com GH de 20% utilizando Alcalase; P10: Hidrolisados proteicos de camarão com GH de 10% utilizando Protamex; P20: Hidrolisados proteicos de camarão com GH de 20% utilizando Protamex.

O hidrolisado proteico obtido a partir da enzima Protamex, com GH de 20% (P20) apresentou maior solubilidade proteica em comparação com os demais hidrolisados. Uma relação positiva foi observada entre o grau de hidrólise e a solubilidade do hidrolisado, indicando que a degradação das proteínas em peptídeos menores resulta em um aumento acentuado da solubilidade, devido a redução da massa molecular da estrutura, o desdobramento das cadeias peptídicas, e a liberação de agregados solúveis (SANTOS et al., 2011; LIU et al.,

2014; GHRIBI et al., 2015; ZHENG et al., 2015). A baixa solubilidade dos hidrolisados com menor grau de hidrólise é atribuída a estrutura da macromolécula rígida, com subunidades ligadas por várias pontes dissulfeto (intermolecular e intramolecular) e interações hidrofóbicas (PARAMAN; HETTIARACHCHY; SCHAEFER, 2007; XU et al., 2016).

3.2.2 Propriedades de Espuma

Tabela 2 apresenta as propriedades de espuma apresentadas pelos hidrolisados proteicos de camarão branco, de formação de espuma e estabilidade da espuma. Os resultados indicam um incremento na formação de espuma dos hidrolisados com GH de 10%, indicando que peptídeos de alta massa molecular são mais susceptíveis a formação de espuma, uma vez que possuem habilidade em formar um filme interfacial coesivo capaz de envolver e reter ar (VILLAMIL; VÁQUIRO; SOLANILLA, 2017).

Observando os resultados apresentados na Tabela 2, verificou-se uma tendência similar aos valores reportados por Salem et al. (2017), que verificaram que as propriedades de espuma de hidrolisados proteicos de polvo *(Octopus vulgaris)* são afetadas de forma negativa pelo aumento do grau de hidrólise. Os hidrolisados com GH de 10% obtidos por Protamex demonstraram capacidade de formação de espuma superior aos hidrolisados com GH de 10% obtidos com Alcalase, indicando que a especificidade de quebra da enzima, libera resíduos de aminoácidos com melhores propriedades espumantes. Para estabilidade da emulsão, os valores mais baixos foram encontrados em pH 4,0. De acordo com Liu et al. (2014) valores mínimos a pH 4 é devido proximidade ao ponto isoelétrico das proteínas envolvidas

Tabela 2 – Propriedades de espuma de hidrolisados proteicos de camarão, com diferentes GH, preparados com as enzimas Alcalase e a Protamex

Hidrolisados	Formação de Espuma (%)				Estabilidade da Espuma (%)			
	pH							
	2,0	4,0	7,0	10,0	2,0	4,0	7,0	10,0
A10	$23,8^{b} \pm 0,4$	$12,8^{b} \pm 0,4$	$25,5^{a} \pm 0,5$	$17,9^{a} \pm 0,6$	$88,3^{a} \pm 1,5$	$73,8^{a} \pm 2,3$	$77,5^{a} \pm 1,7$	$76,8^{a} \pm 2,7$
A20	$14,8^{d} \pm 0,6$	$6,5^{d} \pm 0,4$	$15,5^{c} \pm 0,3$	$13,2^{b} \pm 0,8$	$79,0^{b} \pm 2,6$	$63,6^{b} \pm 2,1$	$75,9^{a} \pm 2,7$	$73,4^{a} \pm 2,0$
P10	$28,8^{a} \pm 0,2$	$17,8^{a} \pm 0,6$	$25,9^{a} \pm 0,8$	$16,8^{a} \pm 0,3$	$80,6^{ab} \pm 2,4$	$69,4^{ab} \pm 1,8$	$82,2^{a} \pm 2,4$	$74,8^{a} \pm 2,7$
P20	$17,7^{c} \pm 0,6$	$10,2^{c} \pm 0,5$	$18,3^{b} \pm 0,5$	$13,4^{b} \pm 0,5$	$77,3^{b} \pm 1,8$	$65,9^{b} \pm 1,1$	$67,8^{b} \pm 2,1$	$70,8^{a} \pm 2,1$

A10: Hidrolisados proteicos de camarão com GH de 10% utilizando Alcalase; A20: Hidrolisados proteicos de camarão com GH de 20% utilizando Alcalase; P10: Hidrolisados proteicos de camarão com GH de 10% utilizando Protamex; P20: Hidrolisados proteicos de camarão com GH de 20% utilizando Protamex; Valores médios ± desvio padrão; Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os hidrolisados proteicos.

3.2.3 Propriedades Emulsificantes

A Tabela 3 apresenta a propriedades emulsificantes dos hidrolisados para índice de emulsificação e índice de estabilidade da emulsão. Para ambos os hidrolisados, os maiores valores de emulsificação foram observados em pH 10. Segundo Taheri et al. (2013), o pH alcalino promove um aumento nas propriedades emulsionantes dos hidrolisados devido ao desdobramento dos polipeptídeos devido às cargas negativas nessa faixa de pH. A repulsão resultante desta alteração permite uma maior orientação na interface proporcionando a exposição de resíduos peptídicos hidrofílicos e hidrofóbicos que promovem interações importantes nas propriedades da emulsão.

O hidrolisado com GH de 10% utilizando a enzima Alcalase apresentou maior índice de emulsificação independente do pH estudado. Witono et al. (2016) sugere uma relação inversa entre a extensão da hidrólise e as propriedades emulsionantes. Tendência semelhante foi observada nos estudos de hidrolisados de colágeno da cavala e hidrolisado de proteína de enguia, onde os pesquisadores apresentaram uma correlação negativa entre tamanho do peptídeo e formação de emulsão (BAHARUDDIN; HALIM; SARBON, 2016; CHI et al., 2014).

O pH afeta as propriedades emulsionantes, alterando a hidrofobicidade da superfície da proteína e a camada protetora que envolve os glóbulos lipídicos Taheri et al. (2013). Valores mínimos de capacidade emulsificante foram observados em pH 4,0, provavelmente porque este pH está próximo ao ponto isoelétrico das proteínas do pescado, onde algumas moléculas são precipitadas ou apresentam cargas reduzidas, resultando numa redução das propriedades emulsionantes.

Tabela 3 – Propriedades emulsificantes de hidrolisados proteicos de camarão, com diferentes GH, preparados com as enzimas Alcalase e a Protamex

Hidrolisados	Índice de emulsificação ($m^2.g^{-1}$)				Índice de estabilidade da emulsão (min)			
	pH							
	2,0	**4,0**	**7,0**	**10,0**	**2,0**	**4,0**	**7,0**	**10,0**
A10	$22,3^{a} \pm 1,1$	$8,3^{a} \pm 0,2$	$24,6^{b} \pm 0,3$	$81,5^{a} \pm 0,2$	$5,2^{a} \pm 1,1$	$3,7^{a} \pm 0,1$	$9,9^{a} \pm 0,15$	$2,9^{b} \pm 0,3$
A20	$9,3^{d} \pm 0,3$	$7,6^{a} \pm 0,3$	$22,5^{c} \pm 0,5$	$69,9^{b} \pm 0,8$	$0,3^{c} \pm 0,01$	$0,4^{b} \pm 0,04$	$3,0^{c} \pm 0,6$	$7,8^{a} \pm 1,1$
P10	$18,1^{b} \pm 0,2$	$6,1^{b} \pm 0,3$	$28,5^{a} \pm 0,8$	$67,8^{c} \pm 0,4$	$4,7^{ab} \pm 0,4$	$0,2^{b} \pm 0,01$	$7,2^{b} \pm 0,6$	$7,1^{a} \pm 0,7$
P20	$11,9^{c} \pm 0,3$	$5,2^{b} \pm 0,3$	$22,3^{c} \pm 0,5$	$56,2^{d} \pm 0,1$	$2,3^{bc} \pm 0,6$	$0,42^{b} \pm 0,03$	$1,9^{c} \pm 0,6$	$4,2^{b} \pm 0,3$

A10: Hidrolisados proteicos de camarão com GH de 10% utilizando Alcalase; A20: Hidrolisados proteicos de camarão com GH de 20% utilizando Alcalase; P10: Hidrolisados proteicos de camarão com GH de 10% utilizando Protamex; P20: Hidrolisados proteicos de camarão com GH de 20% utilizando Protamex; Valores médios ± desvio padrão; Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os hidrolisados proteicos.

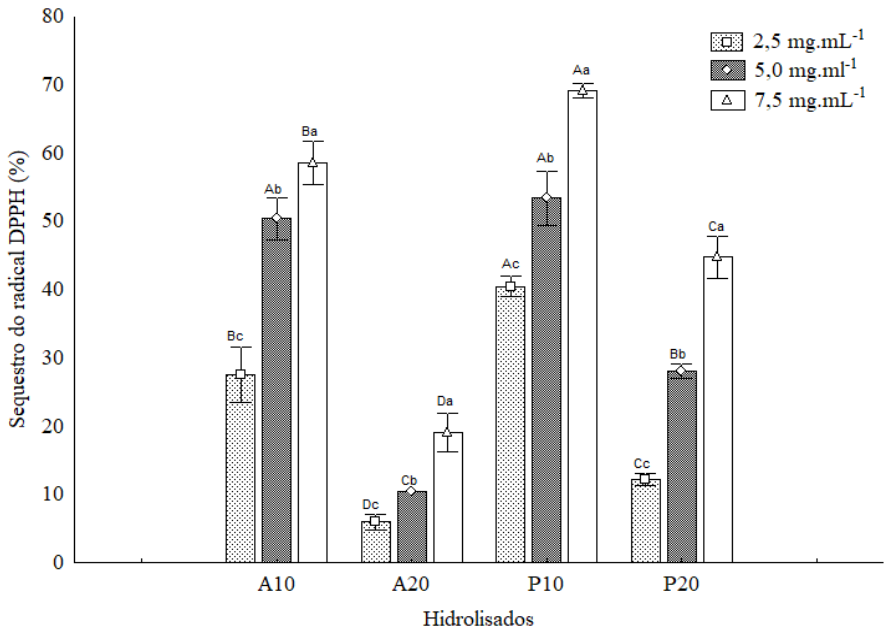
.

3.3 PROPRIEDADE ANTIOXIDANTE DOS HIDROLISADOS

3.3.1 Sequestro do radical livre DPPH

A Figura 3 apresenta a capacidade de sequestro do radical livre DPPH pelos hidrolisados proteicos de camarão branco com diferentes GH.

Figura 3 - Sequestro do radical livre (DPPH) dos hidrolisados proteicos de camarão com diferentes GH, preparados com a Alcalase e a Protamex



A10: Hidrolisados proteicos de camarão com GH de 10% utilizando Alcalase; A20: Hidrolisados proteicos de camarão com GH de 20% utilizando Alcalase; P10: Hidrolisados proteicos de camarão com GH de 10% utilizando Protamex; P20: Hidrolisados proteicos de camarão com GH de 20% utilizando Protamex; Letras minúsculas diferentes para mesma amostra, indicam que há diferença significativa entre as concentrações ($p < 0,05$); Letras maiúsculas diferentes para a mesma concentração, indicam que há diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$).

Os resultados indicam que todas as amostras apresentaram atividade antioxidante frente ao sequestro do radical, indicando os hidrolisados proteicos de camarão como doadores de elétrons, capazes de estabilizar o radical livre DPPH (CHI et al., 2015; SALEM et al., 2017). Além disso, os resultados indicam que um acréscimo na concentração das amostras proporciona uma maior atividade antioxidante, concordando com resultados encontrados por Jemil et al. (2014) e Zhang, Wang e Xu (2008).

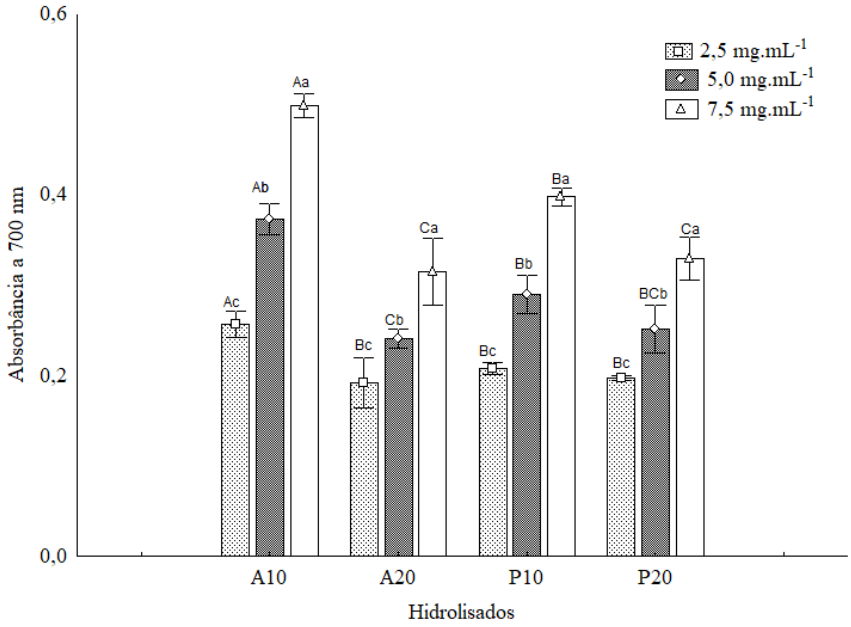
Entre os diferentes hidrolisados, as amostras com menor GH apresentaram maior capacidade de sequestro do radical DPPH em todas as concentrações testadas, quando

comparadas com as amostras de maior GH. Esse comportamento pode estar associado ao comprimento e a composição aminoacídica apresentada pelos hidrolisados proteicos (JEMIL et al., 2014). De acordo com Shavandi et al. (2017), a capacidade de captura do radical DPPH depende da enzima utilizada no processo de hidrólise e da concentração de proteína testada

3.3.2 Poder Redutor

A Figura 4 apresenta o poder redutor dos hidrolisados proteicos de camarão produzidos com Alcalase e Protamex com GH de 10 e 20%. O poder redutor de um composto pode ser usado para medir seu potencial antioxidante e tem sido estudado em diferentes pesquisas (OLIVEIRA et al., 2014; ZHANG; WANG; XU, 2008).

Figura 4 - Poder redutor dos hidrolisados proteicos de camarão com diferentes GH, preparados com a Alcalase e a Protamex



A10: Hidrolisados proteicos de camarão com GH de 10% utilizando Alcalase; A20: Hidrolisados proteicos de camarão com GH de 20% utilizando Alcalase; P10: Hidrolisados proteicos de camarão com GH de 10% utilizando Protamex; P20: Hidrolisados proteicos de camarão com GH de 20% utilizando Protamex; Letras minúsculas diferentes para mesma amostra, indicam que há diferença significativa entre as concentrações ($p < 0,05$); Letras maiúsculas diferentes para a mesma concentração, indicam que há diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$).

Quanto maior o valor de absorbância maior é o poder redutor das amostras. A presença de compostos redutores provoca a redução do complexo Fe^{3+}/ferricianeto na forma ferrosa (Fe^{+2}) através da doação de elétrons, sendo que a concentração de Fe^{+2} é monitorada a

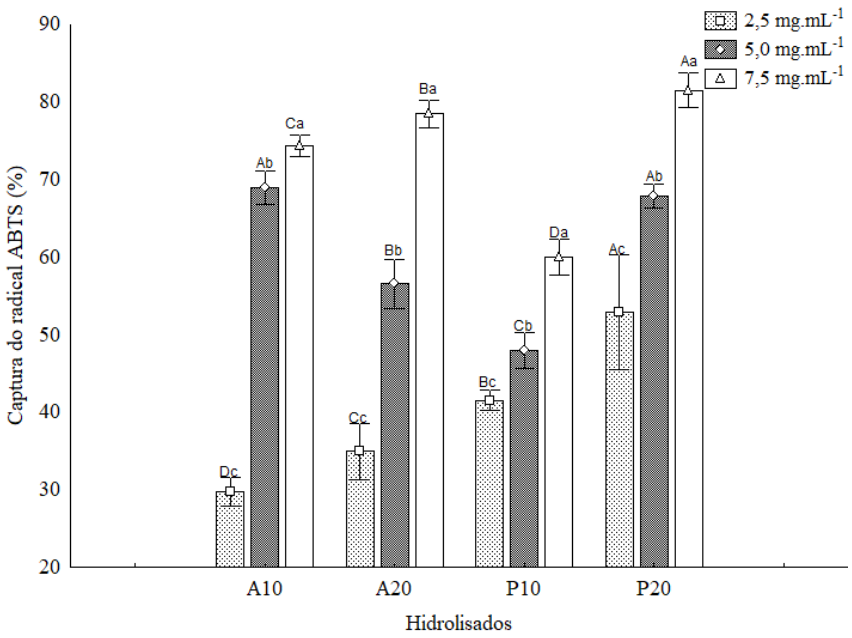
700 nm (JEMIL et al., 2014). Os hidrolisados com GH 10% obtidos com a enzima Alcalase foram os que apresentaram maior poder redutor. Segundo Piotrowicz e Mellado (2015) o tipo de enzima influencia o poder redutor dos hidrolisados, pois para o mesmo grau de hidrólise verificou-se uma diferença significativa.

Assim como, no sequestro do radical DPPH, os hidrolisados com menor grau de hidrólise apresentaram maior poder redutor quando comparados com os hidrolisados de maior grau de hidrólise, indicando que o poder redutor dos hidrolisados está associado ao grau de extensão da hidrólise (KLOMPONG et al., 2007).

3.3.3 Captura do radical ABTS^{+}

O método de captura do radical ABTS é um método utilizado para medir a atividade antioxidante dos compostos hidrofílicos e lipofílicos (CENTENARO et al., 2014). A Figura 4 apresenta a capacidade de captura do radical livre ABTS dos hidrolisados proteicos com diferentes GH.

Figura 5 - Captura do radical livre ABTS dos hidrolisados proteicos de camarão com diferentes GH, preparados com a Alcalase e a Protamex



A10: Hidrolisados proteicos de camarão com GH de 10% utilizando Alcalase; A20: Hidrolisados proteicos de camarão com GH de 20% utilizando Alcalase; P10: Hidrolisados proteicos de camarão com GH de 10% utilizando Protamex; P20: Hidrolisados proteicos de camarão com GH de 20% utilizando Protamex; Letras minúsculas diferentes para mesma amostra, indicam que há diferença significativa entre as concentrações ($p < 0,05$); Letras maiúsculas diferentes para a mesma concentração, indicam que há diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$).

Os resultados encontrados demonstraram que um maior grau de hidrólise (20%) proporcionou um maior efeito de captura do radical ABTS para amostras, divergindo dos resultados encontrados para as análises de poder redutor e capacidade de sequestro do radical DPPH. De acordo com Alemán et al. (2011) a capacidade de captura de um radical exercida pelos hidrolisados não está apenas relacionada com o tamanho da cadeia, mas também com a especificidade de quebra da enzima utilizada no processo de hidrólise.

Em vários estudos envolvendo hidrolisados proteicos e a sua atividade antioxidante, alguns pesquisadores relataram que a capacidade de captura do radical livre melhorou à medida que o grau de hidrólise de proteínas aumentou (THIANSILAKUL; BENJAKUL; SHAHIDI, 2007), enquanto alguns pesquisadores relataram o oposto (KLOMPONG et al., 2007).

4 CONCLUSÃO

O estudo investigou as propriedades funcionais e antioxidantes dos hidrolisados proteicos de camarão obtidos a partir das enzimas Alcalase e Protamex nos GH de 10 e 20%. As funcionalidades e propriedades bioativas dos hidrolisados proteicos foram influenciadas pelo grau de extensão da hidrólise. Os hidrolisados proteicos de camarão branco surgem como compostos com boas propriedades funcionais e antioxidantes, podendo ser adicionados nas formulações de alimentos visando o melhoramento das funcionalidades e aumento da vida útil devido ao considerável poder antioxidante apresentado pelos hidrolisados proteicos de camarão branco.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALEMÁN, A.; PÉREZ-SANTÍN, E.; BORDENAVE-JUCHEREAU, S.; ARNAUDIN, I.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; MONTERO, P. Squid gelatin hydrolysates with antihypertensive, anticancer and antioxidant activity. **Food Research International**, v. 44, n. 4, p. 1044–1051, 2011.

BAHARUDDIN, N. A.; HALIM, N. R. A.; SARBON, N. M. Effect of degree of hydrolysis (DH) on the functional properties and angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity of eel *(Monopterus sp.)* protein hydrolysate. **International Food Research Journal**, v. 23, n. 4, p. 1424–1431, 2016.

CENTENARO, G. S.; SALAS-MELLADO, M.; PIRES, C.; BATISTA, I.; NUNES, M. L.; PRENTICE, C. Fractionation of protein hydrolysates of fish and chicken using membrane ultrafiltration: Investigation of antioxidant activity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 6, p. 2877–2893, 2014.

CHALAMAIAH, M.; DINESH KUMAR, B.; HEMALATHA, R.; JYOTHIRMAYI, T. Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review. **Food Chemistry**, v. 135, n. 4, p. 3020–3038, 2012.

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.

CHEUNG, I. W. Y.; LI-CHAN, E. C. Y. Application of taste sensing system for characterisation of enzymatic hydrolysates from shrimp processing by-products. **Food Chemistry**, v. 145, p. 1076–1085, 2014.

CHI, C.; CAO, Z.; HU, F.; LI, Z.; ZHANG, B. Antioxidant and functional properties of collagen hydrolysates from Spanish mackerel skin as influenced by average molecular weight. **Molecules**, v. 19, n. 8, p. 11211–11230, 2014.

CHI, C. F.; HU, F. Y.; WANG, B.; LI, T.; DING, G. F. Antioxidant and anticancer peptides from the protein hydrolysate of blood clam *(Tegillarca granosa*) muscle. **Journal of Functional Foods**, v. 15, p. 301–313, 2015.

DEY, S. S.; DORA, K. C. Optimization of the production of shrimp waste protein hydrolysate using microbial proteases adopting response surface methodology. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 1, p. 16–24, 2014.

DOS SANTOS, S. D. A.; MARTINS, V. G.; SALAS-MELLADO, M.; PRENTICE, C. Evaluation of functional properties in protein hydrolysates from Bluewing Searobin *(Prionotus punctatus*) obtained with different microbial enzymes. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, n. 8, p. 1399–1406, 2011.

FAO. **The state of world fisheries and aquaculture**. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 2014.

GUNASEKARAN, J.; KANNUCHAMY, N.; KANNAIYAN, S.; CHAKRABORTI, R.; GUDIPATI, V. Protein hydrolysates from shrimp *(Metapenaeus dobsoni)* head waste: optimization of extraction conditions by response surface methodology. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 24, n. 5, p. 429–442, 2015.

JAIN, S.; ANAL, A. K. Production and characterization of functional properties of protein hydrolysates from egg shell membranes by lactic acid bacteria fermentation. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 5, p. 1062–1072, 2017.

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.

LIU, Y.; LI, X.; CHEN, Z.; YU, J.; WANG, F.; WANG, J. Characterization of structural and functional properties of fish protein hydrolysates from surimi processing by-products. **Food Chemistry**, v. 151, p. 459–465, 2014.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDAL., R. J. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.

MARTINI, N. D. N.; NURSYAM, H.; FADJAR, M. The Effects of Different Intensive Culture Systems on White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Muscle Protein Pattern. **Journal of Life Science and Biomedicine**, v. 5, n. 4, p. 97–101, 2015.

MOKNI GHRIBI, A.; MAKLOUF GAFSI, I.; 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.

NGO, D. H.; RYU, B.; KIM, S. K. Active peptides from skate *(okamejei kenojei*) skin gelatin diminish angiotensin-i converting enzyme activity and intracellular free radical-mediated oxidation. **Food Chemistry**, v. 143, p. 246–255, 2014.

PARAMAN, I.; HETTIARACHCHY, N. S.; SCHAEFER, C. Glycosylation and deamidation of rice endosperm protein for improved solubility and emulsifying properties. **Cereal Chemistry**, v. 84, n. 6, p. 593–599, 2007.

PEARCE, K. N.; KINSELLA, J. E. Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 26, n. 3, p. 716–723, 1978.

SALEM, R. B. S.; BKHAIRIA, I.; ABDELHEDI, O.; NASRI, M. *Octopus vulgaris* protein hydrolysates: characterization, antioxidant and functional properties. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 6, p. 1442–1454, 2017.

SATHE, S. K.; SALUNKHE, D. K. Functional properties of the great northern bean (*Phaseolus vulgaris L.*) proteins: Emulsion, foaming, viscosity, and gelation properties. **Journal of Food Science**, v. 46, n. 1, p. 71–81, 1981.

SHAVANDI, A.; HU, Z.; TEH, S. S.; ZHAO, J.; CARNE, A.; BEKHIT, A.; BEKHIT, A. E. D. A. Antioxidant and functional properties of protein hydrolysates obtained from squid pen chitosan extraction effluent. **Food Chemistry**, v. 227, p. 194–201, 2017.

SIMPSON, B. K.; NAYERI, G.; YAYLAYAN, V.; ASHIE, I. N. A. Enzymatic Hydrolysis of Shrimp Meat. **Food Chemistry**, v. 61, n. 1, p. 131–138, 1998.

SOUZA, D. M.; BORGES, V. D.; FURTADO, P.; ROMANO, L. A.; WASIELESKY, W.; MONSERRAT, J. M.; DE OLIVEIRA GARCIA, L. Antioxidant enzyme activities and immunological system analysis of *Litopenaeus vannamei* reared in biofloc technology (BFT) at different water temperatures. **Aquaculture**, v. 451, p. 436–443, 2016.

TAHERI, A.; ANVAR, S. A. A.; AHARI, H.; FOGLIANO, V. Comparison the functional properties of protein Hydrolysates from poultry byproducts and rainbow trout. **Iranian Journal of Fisheries Sciences**, v. 12, n. 1, p. 154–169, 2013.

VILLAMIL, O.; VÁQUIRO, H.; SOLANILLA, J. F. Fish viscera protein hydrolysates: Production, potential applications and functional and bioactive properties. **Food Chemistry**, v. 224, p. 160–171, 2017.

WHITE, J. A.; FRY, J. C.; HART, R. J. An Evaluation of the Waters Pico Tag System for the Amino Acid Analysis of Food Materials. **Journal of Automatic Chemistry**, v. 8, n. 4, p. 170–177, 1986.

WITONO, Y.; TARUNA, I.; WINDRATI, W. S.; AZKIYAH, L.; SARI, T. N. "Wader" (*Rasbora jacobsoni*) Protein Hydrolysates: Production, Biochemical, and Functional Properties. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**, v. 9, p. 482–492, 2016.

XU, X.; LIU, W.; LIU, C.; LUO, L.; CHEN, J.; LUO, S.; MCCLEMENTS, D. J.; WU, L. Effect of limited enzymatic hydrolysis on structure and emulsifying properties of rice glutelin. **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 251–260, 2016.

ZHANG, S. B.; WANG, Z.; XU, S. Y. Antioxidant and antithrombotic activities of rapeseed peptides. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 85, n. 6, p. 521–527, 2008.

ZHENG, X. Q.; WANG, J. T.; LIU, X. L.; SUN, Y.; ZHENG, Y. J.; WANG, X. J.; LI Effect of hydrolysis time on the physicochemical and functional properties of corn glu Protamex hydrolysis. **Food Chemistry**, v. 172, p. 407–415, 2015.

ARTIGO II

EFEITOS ANTIMICROBIANO E ANTITUMORAL APRESENTADOS POR HIDROLISADOS PROTEICOS DE CAMARÃO BRANCO (*Litopenaeus vannamei*)

RESUMO

Este trabalho teve por objetivo obter hidrolisados proteicos de camarão branco e avaliar seu potencial antimicrobiano e antitumoral. A matéria-prima utilizada para o estudo foi o músculo do camarão branco, pertencente à espécie *Litopenaeus vannamei*. Os hidrolisados foram obtidos mediante processo de hidrólise enzimática utilizado as enzimas Alcalase e Protamex até atingir grau de hidrólise de 10 e 20%. Os hidrolisados foram caracterizados quanto à composição aminoacídica, atividade antimicrobiana e antitumoral. A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada frente aos micro-organismos *Escherichia coli* O157:H7 (ATCC 43895) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 10832). A atividade antitumoral dos hidrolisados foi realizada nas amostras com grau de hidrólise de 20%, utilizando as linhagens celulares Melan-a (melanócitos não tumorais) e B16F10 (melanoma). Os resultados indicaram que a enzima Alcalase foi mais eficiente para hidrolisar as proteínas do camarão, quando comparada com a enzima Protamex, uma vez que apresentou menor tempo de reação. Os hidrolisados obtidos apresentaram elevado conteúdo de aminoácidos essenciais e hidrofóbicos. Em relação à atividade antimicrobiana, todos os hidrolisados apresentaram poder de inibição frente aos micro-organismos testados, com exceção do hidrolisado obtido com Alcalase e grau de hidrólise de 20%, que não apresentou efeito inibitório frente ao micro-organismo *Escherichia coli.* Entretanto essa amostra apresentou capacidade de inibir a proliferação celular da linhagem tumoral e, além disso, não apresentou efeito sobre o crescimento da linhagem não tumoral. Diante disso, os hidrolisados proteicos de camarão surgem como importantes agentes antimicrobianos e com potencial antiproliferativo.

Palavras-Chave: Proteínas. Hidrólise. Crustáceo. Micro-organismos. Antiproliferativo.

1 INTRODUÇÃO

Diversos pesquisadores têm como objetivo a obtenção de hidrolisados proteicos como fonte de peptídeos bioativos, os quais são compostos naturalmente presentes dentro das sequências de proteínas nativas dos alimentos, com a intenção de investigar suas propriedades bioativas e funcionais (JANG; LICEAGA; YOON, 2016; JEMIL et al., 2017; YU; FIELD; WU, 2018). A crescente demanda por peptídeos bioativos ocorre devido às diferentes atividades fisiológicas apresentadas por esses compostos, tais como a capacidade antimicrobiana (KUPPUSAMY; ULAGESAN, 2016), antitumoral (BLANCO-MÍGUEZ et al., 2016; WANG et al., 2008), antioxidante (SUWAL et al., 2014; SONG et al., 2015), anti-hipertensiva (JEMIL et al., 2017).

Dentre as atividades fisiológicas estudadas, diversos estudos têm buscado a obtenção de peptídeos bioativos com atividade antimicrobiana, devido aos benefícios que esses compostos podem trazer no combate às doenças transmitidas por alimentos (DTA). A contaminação dos alimentos ocorre devido à presença de micro-organismos, o que resulta em processos de deterioração, provocando perdas nutricionais e formação de toxinas (JAIN; ANAL, 2017; JEMIL et al., 2014; SEDAGHATI et al., 2016; TANG et al., 2015).

Os peptídeos antimicrobianos são carregados positivamente e caracterizados por apresentarem um amplo espectro de atividade antimicrobiana contra numerosos micro-organismos patogênicos, uma composição elevada de aminoácidos hidrofóbicos e moléculas anfipáticas. O mecanismo de ação desses compostos ocorre a partir da interação dos aminoácidos carregados positivamente desses peptídeos com as moléculas carregadas negativamente presentes nas membranas dos agentes patogênicos, formando assim poros que degradam as membranas bacterianas (ABIDI et al., 2013; NAJAFIAN; BABJI, 2012; RADEK; GALLO, 2007; RAJANBABU; CHEN, 2011).

Por outro lado, um grande número de estudos vem explorando a obtenção de peptídeos bioativos com capacidade antitumoral. Assim como os peptídeos antimicrobianos, os peptídeos antitumorais geralmente sãos compostos de baixa massa molecular, obtidos via processos de hidrólise enzimática de elevado grau de extensão (UMAYAPARVATHI et al., 2014). Sua bioatividade é devida aos aminoácidos hidrofóbicos liberados durante a clivagem das ligações peptídicas, que são capazes de inibir o crescimento de diferentes linhagens de células cancerígenas, induzindo apoptose ou inibindo o ciclo celular (CHALAMAIAH; YU; WU, 2018).

A obtenção de agentes antimicrobianos e antitumorais a partir de fontes naturais ganham espaço frente aos compostos de origem sintética. A busca por compostos antimicrobianos é um grande desafio para os pesquisadores e indústrias farmacêuticas, uma vez que devido ao uso excessivo e descontrolado de antibióticos, contribui para o surgimento de agentes patogênicos resistentes aos antibióticos convencionais (SILA et al., 2014). Sah et al. (2015) e Pan et al. (2016) também relatam que a descoberta de novos agentes antitumorais se faz necessária devido à resistência de alguns tipos de células cancerígenas frente aos tratamentos quimioterápicos existentes na atualidade.

Nesse sentido, a pesquisa e o desenvolvimento de medicamentos mais efetivos e menos tóxicos tornaram-se necessários, devido a um interesse crescente pela identificação e caracterização de agentes antimicrobianos e antitumorais naturais. Os organismos marinhos representam uma fonte valiosa para obtenção de compostos bioativos de fonte natural. A biodiversidade do ambiente e a diversidade química associada constituem um recurso praticamente ilimitado de novas substâncias ativas para a área de desenvolvimento de produtos bioativos (JEMIL et al., 2014). Entre as espécies disponíveis, o camarão branco *(Litopenaeus vannamei)* surge como uma espécie amplamente cultivada a nível mundial, sendo caracterizada como uma fonte de elevado teor proteico, podendo ser utilizada para a obtenção de peptídeos bioativos.

Diante disso, o objetivo do trabalho foi investigar o efeito antimicrobiano e antitumoral apresentado por hidrolisados proteicos que foram obtidos a partir da hidrólise enzimática das proteínas presentes no músculo do camarão branco.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

2.1.1 Matéria-prima

O camarão branco *(L. vannamei)* foi proveniente dos tanques de cultivo da Estação Marinha de Aquicultura da Universidade Federal do Rio Grande (EMA- FURG). As espécimes foram despescadas e abatidas por choque térmico a frio, em caixas contendo gelo e água. Após a despesca, as amostras foram transportadas em caixas térmicas contendo gelo para o Laboratório de Processamento de Pescado da Universidade Federal de Rio Grande. No

laboratório foram removidas das espécies o cefalotórax e as carapaças, e o seu músculo foi higienizado e armazenado em sacos plásticos de polietileno contendo 100 g de amostra em cada embalagem. As amostras foram armazenadas à temperatura de -18 ºC para posteriores análises.

2.1.2 Enzimas e Reagentes

As enzimas utilizadas, foram a Alcalase 2,4 L, uma endopeptidase bacteriana produzida a partir da fermentação submersa do *Bacillus licheniformis*, fornecida mediante doação pela Novozymes Latina Americana Ltda, e a Protamex uma mistura de exo e endopeptidases bacterianas, produzida a partir do *Bacillus subitilis,* adquirida da Sigma Aldrich. Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico (P.A.).

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Obtenção dos hidrolisados proteicos de camarão branco

Os hidrolisados proteicos de camarão branco foram obtidos a partir da hidrólise das proteínas do músculo do camarão, que foram homogeneizadas em água destilada na proporção 1: 2 (p:v), e a mistura foi aquecida a 90 °C durante 20 min, para inativação da enzimas endógenas. A reação de hidrólise foi realizada num reator de vidro encamisado e acoplado à um banho termostático. O pH e a temperatura da reação foram mantidos de acordo com as condições ótimas de cada enzima, Alcalase (pH 8, 50 °C) e Protamex (pH 7, 50 °C). O pH da reação de hidrólise foi mantido constante com NaOH (1M). A reação teve início através da adição das enzimas separadamente na proporção de 1% (p:p; enzima:substrato) em relação a massa muscular, e foi interrompida quando atingiu um grau de hidrólise de 10 e 20%. Após a reação, a enzima foi inativada por aquecimento a 90 °C durante 20 min em banho termostático, seguido por arrefecimento à temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 14000 *x* g durante 20 min a 4 °C para separar a matéria-prima não hidrolisada. O sobrenadante foi liofilizado (Liotop L108, São Carlos, Brasil) e, armazenado à -18 °C para posterior análises (ALEMÁN et al., 2011; LIU et al., 2014; NGO; RYU; KIM, 2014). O grau de hidrólise (GH) foi monitorado de acordo com Adler-Nissen (1986).

2.2.2 Composição aminoacídica dos hidrolisados proteicos de camarão branco

A composição aminoacídica dos hidrolisados proteicos de camarão branco foi medida pelo método descrito por White, Fry e Hart (1986) através da cromatografia líquida de alta eficiência pela empresa a CBO - Análises Laboratoriais.

2.2.3 Avaliação da atividade antimicrobiana

2.2.3.1 Micro-organismos

Os micro-organismos utilizados foram *Escherichia coli* O157:H7 (ATCC 43895) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 10832). Esses foram mantidos sob refrigeração a 4 ºC em ágar BHI (*Brain Heart Infusion*) até sua utilização.

2.2.3.2 Reativação dos micro-organismos

A reativação dos micro-organismos foi realizada através da adição de uma alçada desses micro-organismos para um tubo contendo caldo BHI (*Brain Heart Infusion*), seguida de incubação em estufa durante 24 h a 37 ºC. Após o tempo de incubação, uma alçada desse inóculo foi estriada em placas de petri com meio BHI, seguido de incubação por 24 h a 37 ºC, para o isolamento das colônias. Após a multiplicação, as colônias bacterianas foram suspensas em solução salina (NaCl 0,85%; p:v). A densidade do inóculo foi padronizada na concentração 0,5 utilizando a escala padrão de McFarland (10^6 UFC.mL^{-1}).

2.2.3.3 Disco de difusão

A avaliação da atividade antimicrobiana dos hidrolisados proteicos foi realizada pelo método de disco de difusão proposto pelo Manual *Clinical and Laboratory Standards Institute* – CLSI (CLSI, 2012). O ensaio foi realizado em placas de petri estéreis contendo ágar BHI, onde foram inoculados 100 µL de inóculo (10^6 UFC mL^{-1}) dos micro-organismos *E.coli* e *S.aureus* e espalhados com alça de Drigaslki. Em seguida, foram adicionados discos estéreis de papel filtro (0,6 cm de diâmetro) com auxílio de uma pinça estéril. Após, 20 µL de amostra (100 mg.mL^{-1}) foram adicionados sobre os discos de papel e as placas foram incubadas por 24

h a 37 ºC. Logo após a incubação, o halo de inibição foi medido com auxílio de um paquímetro e expresso como mm de inibição.

2.2.4 Atividade antitumoral

2.2.4.1 Células e condição de cultura

As linhagens celulares utilizadas foram Melan-a (melanócitos não tumorais) e B16F10 (melanoma) mantidas em meio Dulbecco MEM (DMEM), suplementado com bicarbonato de sódio (2,0 $g.L^{-1}$), L-glutamina (0,3 $g.L^{-1}$), tampão Hepes (3 $g.L^{-1}$), 10% de soro bovino fetal e 1% de antibióticos e antimicóticos (penicilina [100 $U.mL^{-1}$], estreptomicina [100 $\mu g.mL^{-1}$] e anfotericina B [0,25 $\mu g.mL^{-1}$]) em garrafas de cultura descartáveis a 37 °C sob 5% de CO_2. Para o crescimento das células Melan-a adicionou-se 200 nM de Phorbol Myristate Acetato. Para as análises, as células Melan-a ($1x10^5$ $células.mL^{-1}$) e B16F10 ($5x10^4$ $células.mL^{-1}$) foram incubadas por 24 h para aderência em placas de cultura de 96 poços a 37ºC.

2.2.4.2 Viabilidade Celular

A viabilidade celular foi avaliada pelo método de MTT (3-4,5-dimetiltiazol-2-il,2,5-difeniltetrazolium), com base na detecção da atividade da desidrogenase mitocondrial em células vivas, segundo método descrito por Trindade et al. (1999). Após a aderência durante 24 h (item 2.2.4.1), as células foram expostas a diferentes concentrações (1,0; 10; 100 e 1000 $\mu g.mL^{-1}$) de hidrolisados proteicos por um período de até 72 h. As células controle receberam o mesmo volume de dispersante utilizado para solubilizar as amostras (água destilada estéril). Após tratadas, as células foram incubadas a 37 ºC sob 5% CO_2.

A viabilidade celular foi medida imediatamente após exposição (0 h) e 24, 48 e 72 h pelo ensaio de MTT. Após exposição, adicionou-se 20 µL da solução MTT (5 $mg.mL^{-1}$) em cada poço, e as placas foram incubadas durante 3 h a 37ºC. Durante a incubação, as enzimas ativas das células viáveis transformaram o MTT de cor amarela em cristais de formazan roxo. Após o período de incubação, o meio foi removido e os cristais de formazan foram dissolvidos em 200 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). Os valores de absorbância foram determinados a 490 nm em um leitor de multiplacas.

2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O tratamento dos dados foi realizado utilizando o software Statística for Windows 5.0, nos módulos de análise de variância (ANOVA) e teste de comparação de médias de Tukey ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$).

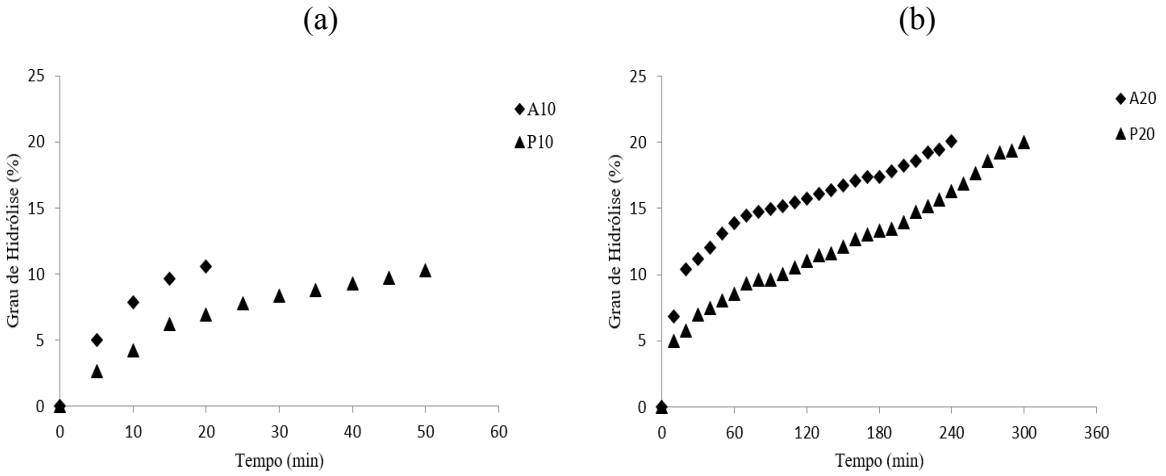
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 GRAU DE HIDRÓLISE

O grau de hidrólise é um parâmetro que indica a clivagem das ligações peptídicas durante o processo de hidrólise (ADLER-NISSEN, 1986). Consequentemente, influencia nas propriedades e funções biológicas apresentadas pelos hidrolisados (SALEM et al., 2017). A Figura 1 (a) e (b) apresenta as curvas de hidrólise dos hidrolisados com GH de 10 e 20%, utilizando as enzimas Alcalase e Protamex. Os GHs dos hidrolisados aumentaram com o acréscimo no tempo de hidrólise, independentemente do tipo de protease utilizada. Haslaniza et al. (2010) relataram que um maior tempo de reação permite que a enzima atinja de forma mais extensa as cadeias peptídicas das proteínas, resultando em um incremento do GH. Os hidrolisados com GH reduzido (<10%), geralmente são indicados para utilização na formulação de alimentos, devido às características melhoradas como agentes espessantes e emulsificantes, enquanto que hidrolisados com GH (>10%) geralmente são reportados como importantes agentes bioativos (AGYEI et al., 2016).

Observando as curvas de hidrólise, verificou-se um aumento acentuado do GH dos hidrolisados (independentemente do tipo de enzima) durante os primeiros minutos de hidrólise, seguido de um aumento gradual até atingir o GH desejado de 10 e 20%. Comportamento similar foi observado para vários substratos proteicos (AMADO et al., 2013; HAMZEH; BENJAKUL; SENPHAN, 2016; HSU; LI-CHAN; JAO, 2011; MARTINS; COSTA; PRENTICE-HERNÁNDEZ, 2009; SBROGGIO et al., 2016; ZAMORA-SILLERO et al., 2018). A fase inicial da hidrólise pode estar relacionada com o grande número de ligações peptídicas clivadas, seguido de uma fase mais lenta, a qual pode ser atribuída a uma diminuição na concentração de ligações peptídicas disponíveis para hidrólise, diminuição da atividade enzimática ou competição entre o substrato e os produtos da hidrólise (INTARASIRISAWAT et al., 2012).

Figura 1 - Curvas de hidrólise enzimática do músculo de camarão branco (*Litopenaeus vannamei*) obtidas a partir das enzimas Alcalase e Protamex com GH de 10% (a) e GH de 20% (b)



A10: Hidrolisados proteicos de camarão com GH de 10% utilizando Alcalase; A20: Hidrolisados proteicos de camarão com GH de 20% utilizando Alcalase; P10: Hidrolisados proteicos de camarão com GH de 10% utilizando Protamex; P20: Hidrolisados proteicos de camarão com GH de 20% utilizando Protamex.

Avaliando os tempos de reação, verificou-se que a enzima Alcalase apresentou um menor tempo para atingir os GHs estudados, de 10 e 20%, indicando que possuía uma maior afinidade de quebra do substrato quando comparada com a enzima Protamex. Para Sila e Bougatef (2016), a afinidade das enzimas durante a reação de hidrólise é um dos fatores que mais influenciam na bioatividade dos peptídeos. A enzima Alcalase em 240 min de reação, atingiu o GH máximo de 20%, enquanto que a enzima Protamex, para atingir o mesmo GH apresentou um tempo de reação de 300 min. Piotrowicz e Mellado (2015) hidrolisaram proteínas de anchoita (*Engraulis anchoita*) com diferentes enzimas e verificaram que a enzima Alcalase se destacou quando comparada com a enzima Protamex, apresentando um maior GH para o mesmo tempo de reação.

Zamora-Sillero et al. (2018) hidrolisaram o subproduto da carpa comum (*Cyprinus carpio)* usando as enzimas Alcalase e Protamex até alcançar GH de 10 e 15%. Os autores verificaram que a Alcalase teve maior afinidade com o substrato, indicando que ambas enzimas têm diferentes afinidades proteolíticas com o substrato. Kechaou et al. (2009) sugerem que a enzima Alcalase possui maior afinidade com as proteínas provenientes de recursos aquáticos, devido a protease conferir um maior grau de hidrólise quando comparada com a enzima Protamex.

As enzimas Alcalase e Protamex são proteases que possuem mecanismos diferentes de atuação, sendo a Alcalase uma endopeptidase que atua nas regiões internas das cadeias

peptídicas, enquanto que a Protamex é uma mistura de exo e endo, que cliva as ligações nos finais da cadeia proteica. Segundo Mendonça e Martin, (1998) as proteases diferem na sua capacidade de ligar-se ao substrato, e essa ligação é influenciada pela conformação do substrato proteico e a acessibilidade das ligações peptídicas susceptíveis a hidrolise proteolítica.

3.2 COMPOSIÇÃO DE AMINOÁCIDOS

A composição de aminoácidos dos hidrolisados proteicos influencia nas suas bioatividades (CHALAMAIAH et al., 2012). As propriedades apresentadas pelos aminoácidos como a capacidade de absorver água, presença de cargas ou anéis aromáticos, influenciam na habilidade dos hidrolisados em exercer determinadas funções biológicas, como atividade antimicrobiana e antitumoral (CHALAMAIAH; YU; WU, 2018; SILA et al., 2014; WANG et al., 2008). A Tabela 1 apresenta a composição do aminoacídica dos hidrolisados proteicos de camarão.

Analisando os dados apresentados na Tabela 1, verifica-se como aminoácidos majoritários, para todas as amostras analisadas, foram o ácido glutâmico seguido do ácido aspártico. Esse perfil sugere que os hidrolisados obtidos, independentemente do tipo de enzima ou grau de hidrólise, podem ser considerados importantes agentes antimicrobianos. Beaulieu et al. (2013) estudaram a atividade antimicrobiana de diferentes frações peptídicas obtidas de subprodutos de caranguejo, e verificaram que a fração com maior teor de ácido glutâmico e ácido aspártico apresentou maior atividade inibitória contra bactérias Gram positivas e Gram negativas. Segundo Brogden (2005) o conteúdo de ácido glutâmico e ácido aspártico contribui para atividade antimicrobiana dos peptídeos.

Os hidrolisados proteicos de camarão apresentaram teor de aminoácidos essenciais máximos de 363,87 $mg_{aminoácido}/g_{proteína}$ (A20) e mínimos de 337,01 $mg_{aminoácido}/g_{proteína}$ (P10). Os resultados encontrados apresentam-se em concentração superior ao requerimento proteico recomendado pela Organização Mundial da Saúde, tanto para o consumo de uma criança como um adulto (WHO/FAO/UNU EXPERT CONSULTATION, 2007), que determina como proteína padrão de referência uma concentração mínima de 320 $mg_{aminoácido}/g_{proteína}$. Essa constatação faz dos hidrolisados obtidos uma importante fonte de aminoácidos essenciais. Para Blanco e Bressani (1991) a qualidade de uma proteína refere-se a sua capacidade de satisfazer os requerimentos nutricionais do homem por aminoácidos essenciais para fins de síntese proteica.

Tabela 1 – Composição aminoacídica dos hidrolisados proteicos de camarão branco produzidos com as enzimas Alcalase e Protamex para os GH de 10 e 20%

Aminoácidos	**Hidrolisados**				**Requerimento FAO**	
($mg_{aminoácido}/g_{proteína}$)	**A10**	**A20**	**P10**	**P20**	**Criança**	**Adulto**
Essenciais						
Isoleucina	36,8	40,5	34,2	35,5	28,0	13,0
Leucina	66,2	71,3	65,9	66,1	66,0	19,0
Lisina	80,0	85,9	83,3	83,0	58,0	16,0
Triptofano	nd	nd	nd	nd	11,0	5,0
Histidina	21,9	21,4	22,3	21,4	19,0	16,0
Treonina	35,9	38,0	35,9	36,3	14,0	9,0
Valina	40,7	41,3	37,8	39,0	35,0	13,0
Metionina	22,9	24,4	22,3	23,2		
Cistina	10,4	10,9	9,4	10,7		
Fenialanina	37,7	41,2	35,3	36,7		
Tirosina	27,9	29,8	25,0	26,8		
∑Sulfurados	33,3	35,3	31,7	33,9	25,0	17,0
∑Essenciais	342,1	363,9	337,0	341,1	319,0	127,0
Ácido Aspártico	110,3	120,6	114,2	116,2		
Ácido Glutâmico	145,8	153,8	154,3	150,3		
Serina	37,0	39,5	36,8	37,6		
Glicina	80,9	79,4	85,7	83,4		
Arginina	100,5	100,9	101,7	98,7		
Alanina	55,6	58,2	59,2	57,8		
Prolina	76,0	68,9	75,6	70,0		
∑ Hidrofóbicos	374,2	386,4	364,8	365,7		

A10: Hidrolisados proteicos de camarão com GH de 10% utilizando Alcalase; A20: Hidrolisados proteicos de camarão com GH de 20% utilizando Alcalase; P10: Hidrolisados proteicos de camarão com GH de 10% utilizando Protamex; P20: Hidrolisados proteicos de camarão com GH de 20% utilizando Protamex; nd: não determinado; FAO: Food and Agriculture Organization; ∑Sulfurados: Somatório de aminoácidos sulfurados (metionina e cisteina); ∑Essenciais: Somatório de aminoácidos essenciais (isoleucina, leucina, lisina, triptofano, histidina, treonina, valina, metionina, cisteina, fenilalanina, tirosina); ∑Hidrofóbicos: Somatório de aminoácidos hidrofóbicos (alanina, cisteina, fenilalalina, isoleucina, leucina, metionina, prolina, tirosina, valina).

Níveis elevados do aminoácido lisina foram encontrados nos hidrolisados proteicos de camarão quando comparados com os resultados encontrados Rajabzadeh et al. (2018). Esses

autores hidrolisaram proteínas de ovas de truta-arco-íris *(Oncorhynchus mykiss)* utilizando as enzimas Pepsina e Alcalase e encontram valores entre 41,8 e 46,9% para o aminoácido lisina. Segundo Morris (2005) a lisina atua como percursor da carnitinina, aminoácido que ajuda a regular os níveis de colesterol no sangue, sendo considerado extremamente raro em cereais.

Entre os aminoácidos não essenciais, o ácido glutâmico foi o aminoácido de maior concentração entre as amostras, indicando que os hidrolisados obtidos podem exercer efeito significativo na regulação do sistema imunológico, devido a esse aminoácido exercer funções vitais para o crescimento e manutenção da vida (WATFORD, 2015).

O conteúdo de aminoácidos essenciais aumentou à medida que o grau de hidrólise foi estendido. Entretanto, comportamento oposto foi observado por Venuste et al. (2013), quando estudaram a influência da hidrólise enzimática e o tipo enzimático sobre as propriedades funcionais e antioxidantes de hidrolisados proteicos. Isto indica que a liberação de conteúdo maior de aminoácidos não está relacionada apenas ao número de ligações peptídicas quebradas, mas à especificidade e afinidade de cada enzima utilizada durante o processo de hidrólise.

A composição aminoacídica para as amostras diferiu em relação ao tipo de enzima e GH, apesar da matéria-prima utilizada no trabalho ser a mesma para todas as amostras. Isso ocorre porque em uma hidrólise enzimática, a capacidade da protease para clivar ligações peptídicas depende das interações físicas entre o substrato (matéria-prima) e a enzima (protease) no ambiente aquoso presente durante a hidrólise (LIASET; ESPE, 2008).

Os aminoácidos hidrofóbicos, como alanina, cisteína, fenilalalina, isoleucina, leucina, metionina, e valina, possuem a capacidade de interagir com a membrana celular de diferentes células cancerosas (KIM et al., 2012, 2013). Uma proporção maior de aminoácidos hidrofóbicos foi relacionada com o maior GH, devido à liberação de grupamentos hidrofóbicos que se encontravam no interior das moléculas proteicas (FITZGERALD; O'CUINN, 2006).

A hidrofobia dos peptídeos desempenha papel fundamental na modulação dos efeitos sobre as células tumorais (HUANG et al., 2011). A presença de aminoácidos hidrofóbicos possibilita que os peptídeos tenham a capacidade de interagir sobre a membrana das células cancerosas resultando em efeitos antiproliferativos sobre as mesmas (SERRA et al., 2014). Observando nossos resultados, verificamos que os hidrolisados com maior grau de hidrólise surgem como possíveis agentes antitumorais, devido a concentração elevada de aminoácidos hidrofóbicos dessas amostras.

3.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os compostos naturais atualmente são reportados como promissores a superar a resistência bacteriana de uma ampla gama de micro-organismos (KOBBI et al., 2018). O presente trabalho estudou o efeito antimicrobiano dos diferentes hidrolisados proteicos de camarão branco frente às bactérias Gram positiva (*Staphylococcus aureus)* e Gram negativa (*Escherichia Coli).*

A Tabela 2 apresenta a atividade antimicrobiana dos hidrolisados proteicos de camarão branco na concentração de 100 $mg.mL^{-1}$ utilizando diferentes proteases comerciais (Alcalase ou Protamex) com GH de 10 e 20%, avaliada pelo método de disco de difusão. Esse método é de grande utilização para avaliar a atividade antimicrobiana de compostos e permite a quantificação das zonas de inibição contra inúmeras bactérias (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016).

Tabela 2 – Atividade antimicrobiana dos hidrolisados proteicos de camarão branco produzidos com as enzimas Alcalase e Protamex para os GH de 10 e 20%.

Amostra	**Halo de inibição**	
	Staphylococcus aureus	***Escherichia coli***
A10	++	++
A20	++	-
P10	+	+
P20	+	+

A10: Hidrolisados proteicos de camarão com GH de 10% utilizando Alcalase; A20: Hidrolisados proteicos de camarão com GH de 20% utilizando Alcalase; P10: Hidrolisados proteicos de camarão com GH de 10% utilizando Protamex; P20: Hidrolisados proteicos de camarão com GH de 20% utilizando Protamex; -: sem atividade; +: halo de inibição inferior a 10 mm; ++: halo de inibição superior a 10 mm; valores médios ± desvio padrão.

Observando os resultados obtidos (Tabela 2), verificou-se que de uma forma geral os hidrolisados proteicos de camarão branco apresentaram poder de inibição frente a multiplicação dos microrganismos testados, com exceção o hidrolisado A20, que não apresentou inibição frente a *Escherichia Coli.* A sensibilidade inferior do hidrolisado A20 frente a Gram negativa pode ser devido às diferenças nas estruturas em relação a Gram positiva, pois a parede celular das Gram Negativas contém, além de uma membrana citoplasmática, uma membrana externa composta de lipopolissacarídeos, fosfolipídios, lipoproteínas e proteínas (SEDAGHATI et al., 2016).

A ausência de inibição apresentada pelos hidrolisados com Alcalase no maior GH, contraria a ideia reportada por Gómez-Guillén et al. (2010), que indica que quanto menor o tamanho da molécula maior a atividade antimicrobiana, devido a facilidade de interação com as membranas bacterianas. Os resultados encontrados para A20 foram semelhantes ao estudo de Jemil et al. (2017) que verificaram que um aumento no tempo de hidrólise resultou na perda atividade antimicrobiana contra o micro-organismo *Escherichia coli.* Da mesma forma, Beaulieu et al. (2015) verificou que as amostras de maior massa molecular exibiram atividade antimicrobiana somente contra a bactéria Gram positiva (*S. aureus*).

Os hidrolisados obtidos via adição da enzima Protamex apresentaram halos de inibição inferiores aos halos apresentados pelos hidrolisados com Alcalase. Entretanto, os hidrolisados com Protamex apresentaram poder de inibição para ambos micro-organismos testados, fato que não aconteceu com os hidrolisados obtidos via Alcalase. A intensidade da atividade antimicrobiana apresentadas pelos hidrolisados é influenciada pelo tamanho da cadeia proteica, natureza iônica, composição e sequência peptídica (POWERS; HANCOCK, 2003; SHAI, 2002; WALD et al., 2016). Os peptídeos catiônicos, por exemplo, são capazes de permeabilizar a membrana bacteriana induzindo a absorção de íons, levando à despolarização da membrana externa de bactérias Gram positivas ou a sua permeabilização, no caso de bactérias Gram negativas (JEMIL et al., 2016).

Diferentes estudos relatam que a atividade antimicrobiana dos peptídeos é influenciada pela presença de resíduos de aminoácidos básicos como lisina, arginina e histidina na cadeia lateral do peptídeo. A presença desses aminoácidos de carga positiva é que facilita a interação entre os peptídeos e membranas bacterianas carregadas negativamente ou paredes celulares, incluindo lipopolissacarídeos (BROWN; HANCOCK, 2006; KOBBI et al., 2018; SEDAGHATI et al., 2014, 2015, 2016).

Ainda sobre os hidrolisados proteicos via Protamex, é possível verificar que os mesmos apresentaram conteúdo inferior de aminoácidos hidrofóbicos quando comparados aos hidrolisados obtidos via Alcalase. Kobbi et al. (2018) verificou que o efeito antimicrobiano aumentava à medida que o conteúdo hidrofóbico era reduzido e que a composição dos hidrolisados com elevado poder antimicrobiano era caracterizada pela presença de glicina, arginina e ácido aspártico, aminoácidos esses com concentrações semelhantes encontrados tanto para os hidrolisados com Alcalase e Protamex.

3.4 ATIVIDADE ANTITUMORAL

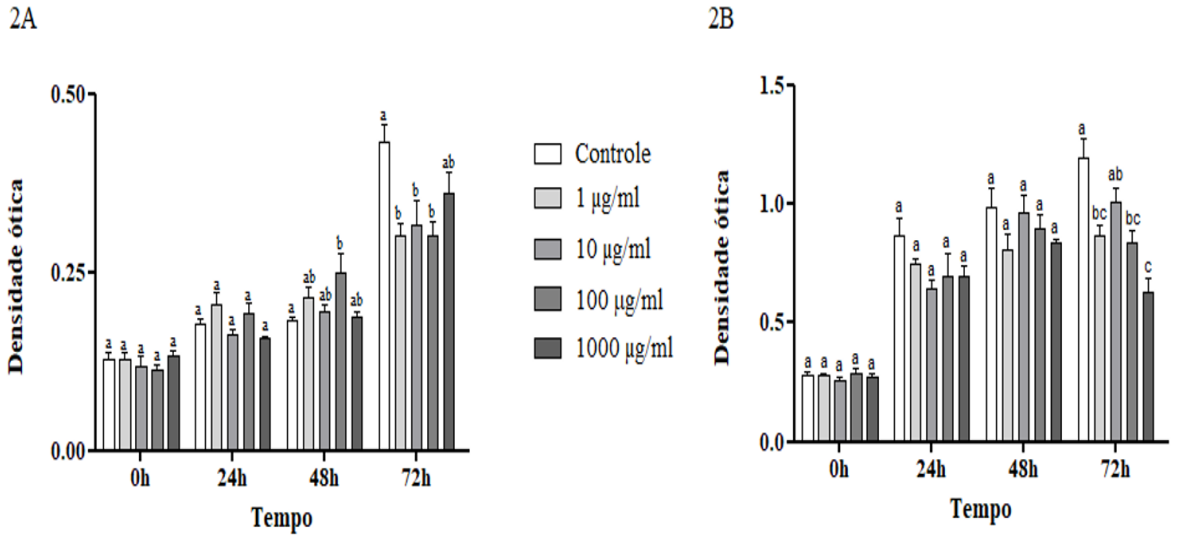
Os fármacos utilizados no tratamento contra diversos tipos de câncer geralmente são selecionados por sua capacidade de controlar a proliferação celular (DE ALMEIDA et al., 2005). Assim, utilizar métodos que avaliem a viabilidade celular, como o ensaio de MTT em linhagens de células, pode ser considerada uma alternativa eficaz para testar o efeito antitumoral de um composto (CHI et al., 2015). Nesse estudo, foi possível avaliar o crescimento celular de diferentes linhagens, tanto tumorais como não tumorais, através de uma reação colorimétrica (MOSMANN, 1983).

A atividade antitumoral de um composto é influenciada pela capacidade de interação com a membrana celular. Os compostos com menor massa molecular têm maior mobilidade, o que parece aumentar as interações com os componentes das células tumorais e melhorar a atividade antiproliferativa (JUMERI; KIM, 2011). Estudos que avaliam a atividade biológica de peptídeos reportam que a reduzida massa molecular confere uma ação antiproliferativa mais efetiva (KIM et al., 2013; PIHLANTO-LEPPÄLÄ, 2000; WANG et al., 2018). Nesse sentido, as amostras de hidrolisados proteicos com GH de 20% foram escolhidas para avaliar seu efeito antitumoral. As Figuras 2 e 3 mostram a proliferação celular pelo ensaio MTT das células Melan-a e B16F10, após a exposição à diferentes concentrações (1 $\mu g.mL^{-1}$, 10 $\mu g.mL^{-1}$, 100 $\mu g.mL^{-1}$ e 1000 $\mu g.mL^{-1}$) de hidrolisados proteicos de camarão branco nos tempos 0 h, 24 h, 48 h e 72 h.

Melanócitos não tumorais (Melan-a) e melanoma (B16F10) foram utilizados, uma vez que o melanoma cutâneo é um tipo de câncer de pele que tem origem nos melanócitos (células produtoras de melanina, substância que determina a cor da pele) e tem predominância em adultos brancos (INCA, 2018).

Analisando a Figura (2A), não foram observadas diferenças entre o tratamento com hidrolisado e o grupo controle em todos os tempos analisados, indicando que A20 não teve efeito significativo sobre o crescimento celular. Observando os resultados expressos para viabilidade celular das linhagens contra os hidrolisados proteicos de camarão, verificou-se que neste estudo, o ensaio MTT mostrou efeito dependente de concentração e tempo. Outros pesquisadores relataram o mesmo comportamento quando estudaram a atividade antiproliferativa de proteínas provenientes de recursos aquáticos (MA et al., 2015; SONG et al., 2015; UMAYAPARVATHI et al., 2014).

Figura 2 - Proliferação celular medida pelo ensaio de MTT das células de Melan-a (2A) e B16F10 (2B) após exposição a diferentes concentrações de hidrolisado proteico de camarão utilizando Alcalase com GH de 20% (A20)



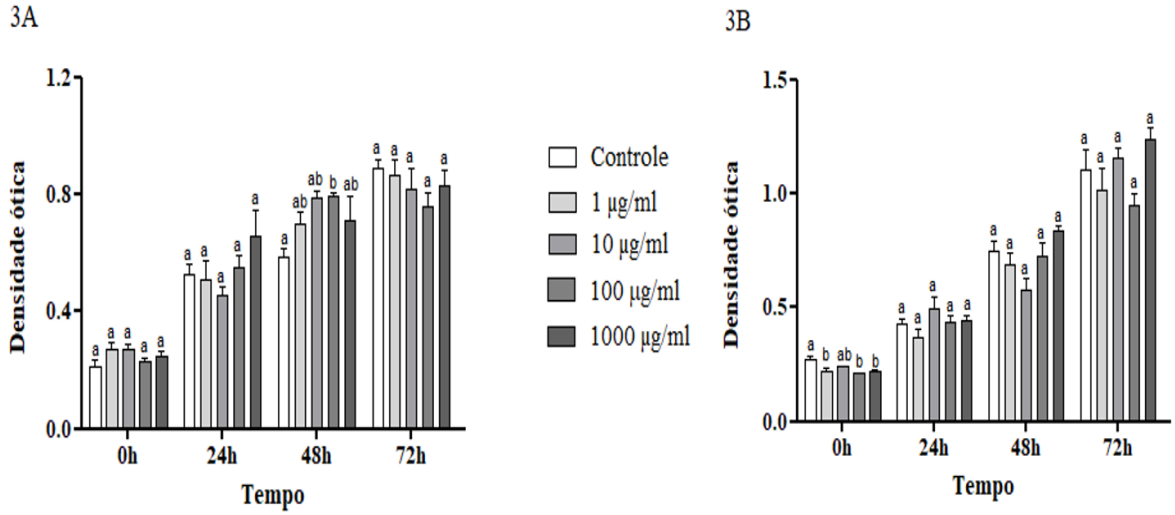
Valores médios ± desvio padrão; Letras iguais indicam que não há diferença significativa em relação ao controle ($p > 0,05$) dentro de cada tempo.

Com relação a Figura (2B), o mesmo hidrolisado (A20) foi utilizado para o tratamento de células B16F10, e para essa linhagem após 72 horas de tratamento com 1, 100 e 1000 $\mu g.mL^{-1}$ de hidrolisado foi observada uma diminuição no número de células viáveis. Esses resultados sugerem que a maior concentração utilizada nesta análise causou efeito citotóxico apenas na linhagem celular tumoral, sugerindo seu potencial antitumoral.

A citotoxicidade de peptídeos de pescado sobre células normais vem sendo estudada com maior frequência nos últimos anos (FU; ZHAO, 2013; HSU; LI-CHAN; JAO, 2011; PAN et al., 2016). A citotoxicidade de um composto é reportada pelo dano que ele pode causar as células (DEMARCO et al., 1998). Fonseca et al. (2017) quando estudaram o efeito citotóxico de peptídeos de pescado sobre os hepatócitos de *zebrafish,* verificaram também que os hidrolisados proteicos de pescado não foram tóxicos às células normais.

Após o tratamento com P20, as células de Melan-a (Fig. 3A) e B16F10 (Fig. 3B) não apresentaram alteração de proliferação celular até 72 h. Estes resultados indicam que esse hidrolisado não apresentou capacidade antitumoral porque não inibiu a proliferação celular da linhagem B16F10. Além disso, o P20 assim como A20 não alterou a proliferação da linhagem celular de melanócitos não tumorais.

Figura 3 - Proliferação celular medida pelo ensaio de MTT das células de Melan-a (3A) e B16F10 (3B) após exposição a diferentes concentrações de hidrolisado proteico de camarão utilizando Protamex com GH de 20% (P20).



Valores médios ± desvio padrão; Letras iguais indicam que não há diferença significativa (p> 0,05) para cada tempo.

Segundo Blanco-Míguez et al. (2016), um composto antitumoral deve apresentar algumas características, como baixa massa molecular, boa difusão celular, deve afetar uma ou mais vias moleculares específicas envolvidas nos processos de carcinogênese e geralmente não deve ser genotóxico. Com base nessas afirmações, os resultados obtidos indicam que A20 apresenta potencial para consideração como um composto antitumoral, uma vez que apresentou reduzido tamanho, devido ao elevado GH e, um efeito sobre a linhagem tumoral e além disso, não foi citotóxico às células da linhagem de Melan-a.

Wang et al. (2008) e Wang et al. (2018) relataram que a composição da parede celular das células cancerígenas apresenta elevada concentração de fosfolipídios, geralmente de 3 a 7 vezes maior que as paredes das células normais. O hidrolisado A20 apresentou maior conteúdo de aminoácidos hidrofóbicos (Tabela 1), o que poderia levar a interação desse composto a uma maior interação com a parede celular da linhagem BF16F10 e explicaria a seletividade desse composto contra as diferentes linhagens estudadas. Song et al. (2015) relataram que resíduos hidrofóbicos de Alanina e Leucina são considerados como importantes fatores para a atividade antiproliferativa dos peptídeos. Neste estudo, os resíduos hidrofóbicos de Alanina e Leucina foram superiores para o hidrolisado A20 quando comparado com P20, podendo justificar o efeito antitumoral desse composto.

4 CONCLUSÃO

A hidrólise enzimática das proteínas do camarão branco utilizando as enzimas Alcalase e Protamex é uma alternativa para a obtenção de hidrolisados proteicos com atividade antimicrobiana e antitumoral. No presente estudo, os hidrolisados proteicos de camarão obtidos via hidrólise com as proteases escolhidas sob o grau de hidrólise 10 e 20% apresentaram atividade antimicrobiana. Os hidrolisados proteicos de camarão não foram citotóxicos às linhagens não tumorais e apenas o hidrolisado com Alcalase e GH de 20% apresentou efeito antitumoral. Além disso, a enzima Alcalase apresentou menor tempo de reação de hidrólise e liberou maior conteúdo de aminoácidos hidrofóbicos essenciais para os efeitos antimicrobiano e antitumoral.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIDI, F.; AISSAOUI, N.; GAUDIN, J. C.; CHOBERT, J. M.; HAERTLÉ, T.; MARZOUKI, M. N. Analysis and Molecular Characterization of Botrytis cinerea Protease Prot-2. Use in Bioactive Peptides Production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 170, n. 2, p. 231–247, 2013.

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

AGYEI, D.; ONGKUDON, C. M.; WEI, C. Y.; CHAN, A. S.; DANQUAH, M. K. Bioprocess challenges to the isolation and purification of bioactive peptides. **Food and Bioproducts Processing**, v. 98, p. 244–256, 2016.

ALEMÁN, A.; PÉREZ-SANTÍN, E.; BORDENAVE-JUCHEREAU, S.; ARNAUDIN, I.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; MONTERO, P. Squid gelatin hydrolysates with antihypertensive, anticancer and antioxidant activity. **Food Research International**, v. 44, n. 4, p. 1044–1051, 2011.

AMADO, I. R.; VÁZQUEZ, J. A.; GONZÁLEZ, M. P.; MURADO, M. A. Production of antihypertensive and antioxidant activities by enzymatic hydrolysis of protein concentrates recovered by ultrafiltration from cuttlefish processing wastewaters. **Biochemical Engineering Journal**, v. 76, p. 43–54, 2013.

BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, n. 2, p. 71–79, 2016.

BEAULIEU, L.; BONDU, S.; DOIRON, K.; RIOUX, L. E.; TURGEON, S. L. Characterization of antibacterial activity from protein hydrolysates of the macroalga

Saccharina longicruris and identification of peptides implied in bioactivity. **Journal of Functional Foods**, v. 17, p. 685–697, 2015.

BEAULIEU, L.; THIBODEAU, J.; BONNET, C.; BRYL, P.; CARBONNEAU, M. É. Detection of antibacterial activity in an enzymatic hydrolysate fraction obtained from processing of Atlantic rock crab (*Cancer irroratus*) by-products. **PharmaNutrition**, v. 1, n. 4, p. 149–157, 2013.

BLANCO-MÍGUEZ, A.; GUTIÉRREZ-JÁCOME, A.; PÉREZ-PÉREZ, M.; PÉREZ-RODRÍGUEZ, G.; CATALÁN-GARCÍA, S.; FDEZ-RIVEROLA, F.; LOURENÇO, A.; SÁNCHEZ, B. From amino acid sequence to bioactivity: The biomedical potential of antitumor peptides. **Protein Science**, v. 25, n. 6, p. 1084–1095, 2016.

BLANCO, A.; BRESSANI, R. Biodisponibilidad de aminoácidos in el frijol (*Plhaseolus vulgaris*). **Archivos Latinoamericano de Nutrición**, v. 41, p. 38–51, 1991.

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

BROWN, K. L.; HANCOCK, R. E. W. Cationic host defense (antimicrobial) peptides. **Current Opinion in Immunology**, v. 18, n. 1, p. 24–30, 2006.

CHALAMAIAH, M.; DINESH KUMAR, B.; HEMALATHA, R.; JYOTHIRMAYI, T. Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review. **Food Chemistry**, v. 135, n. 4, p. 3020–3038, 2012.

CHALAMAIAH, M.; YU, W.; WU, J. Immunomodulatory and anticancer protein hydrolysates (peptides) from food proteins: A review. **Food Chemistry**, v. 245, p. 205–222, 2018.

CHI, C. F.; HU, F. Y.; WANG, B.; LI, T.; DING, G. F. Antioxidant and anticancer peptides from the protein hydrolysate of blood clam (*Tegillarca granosa*) muscle. **Journal of Functional Foods**, v. 15, p. 301–313, 2015.

CLSI. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests ; approved atandard**. [s.l: s.n.]. v. 32, 2012.

DE ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; BARRETT REINA, L. D. C.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L.; LOPES, M. T. P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: Uma introdução. **Quimica Nova**, v. 28, n. 1, p. 118–129, 2005.

DEMARCO, F. F.; TARQUINIO, S. B. C. C.; JAEGER, M. M. M.; MATSON, E. Evaluation of the cytotoxicity of two dentin-bonding systems. **Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo**, v. 12, n. 4, p. 375–382, 1998.

FITZGERALD, R. J.; O'CUINN, G. Enzymatic debittering of food protein hydrolysates. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 2, p. 234–237, 2006.

FONSECA, R. A. S.; SILVA, C. M.; ROSA, G. F.; PRENTICE, C. Peptides obtained from proteins of cobia (*Rachycentron canadum*): A study of potentially safe antioxidants for food. **International Food Research Journal**, v. 24, n. 6, p. 2500–2508, 2017.

FU, Y.; ZHAO, X. H. In vitro responses of hFOB1.19 cells towards chum salmon (Oncorhynchus keta) skin gelatin hydrolysates in cell proliferation, cycle progression and apoptosis. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 1, p. 279–288, 2013.

GÓMEZ-GUILLÉN, M.; ME, L.-C.; A, A. A. L. D. L.; GIMÉNEZ, B.; MONTERO, P. Antioxidant and antimicrobial peptide fractions from squid and tuna skin gelatin. **Sea by-products as real material**, v. 661, n. 2, p. 89–115, 2010.

HAMZEH, A.; BENJAKUL, S.; SENPHAN, T. Comparative study on antioxidant activity of hydrolysates from splendid squid (*Loligo formosana*) gelatin and protein isolate prepared using protease from hepatopancreas of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 9, p. 3615–3623, 2016.

HASLANIZA, H.; MASKAT, M. Y.; WAN AIDA, W. M.; MAMOT, S. The effects of enzyme concentration, temperature and incubation time on nitrogen content and degree of hydrolysis of protein precipitate from cockle (*Anadara granosa*) meat wash water. **International Food Research Journal**, v. 17, n. 1, p. 147–152, 2010.

HSU, K. C.; LI-CHAN, E. C. Y.; JAO, C. L. Antiproliferative activity of peptides prepared from enzymatic hydrolysates of tuna dark muscle on human breast cancer cell line MCF-7. **Food Chemistry**, v. 126, n. 2, p. 617–622, 2011.

HUANG, Y. -B.; WANG, X. -F.; WANG, H. -Y.; LIU, Y.; CHEN, Y. Studies on Mechanism of Action of Anticancer Peptides by Modulation of Hydrophobicity Within a Defined Structural Framework. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 10, n. 3, p. 416–426, 2011.

INCA. **Câncer**. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=317>. Acesso em: 4 fev. 2018.

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

JAIN, S.; ANAL, A. K. Production and characterization of functional properties of protein hydrolysates from egg shell membranes by lactic acid bacteria fermentation. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 5, p. 1062–1072, 2017.

JANG, H. L.; LICEAGA, A. M.; YOON, K. Y. Purification, characterisation and stability of an antioxidant peptide derived from sandfish (*Arctoscopus japonicus*) protein hydrolysates. **Journal of Functional Foods**, v. 20, p. 433–442, 2016.

JEMIL, I.; ABDELHEDI, O.; MORA, L.; NASRI, R.; ARISTOY, M. C.; JRIDI, M.; HAJJI, M.; TOLDRÁ, F.; NASRI, M. Peptidomic analysis of bioactive peptides in zebra blenny (*Salaria basilisca*) muscle protein hydrolysate exhibiting antimicrobial activity obtained by fermentation with Bacillus mojavensis A21. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 12, p. 2186–2197, 2016.

JEMIL, I.; ABDELHEDI, O.; NASRI, R.; MORA, L.; JRIDI, M.; ARISTOY, M. C.; TOLDRÁ, F.; NASRI, M. Novel bioactive peptides from enzymatic hydrolysate of Sardinelle (*Sardinella aurita*) muscle proteins hydrolysed by Bacillus subtilis A26 proteases. **Food Research International**, v. 100, p. 121–133, 2017.

JEMIL, I.; JRIDI, M.; NASRI, R.; KTARI, N.; BEN SLAMA-BEN SALEM, R.; MEHIRI, M.; HAJJI, M.; NASRI, M. Functional, antioxidant and antibacterial properties of protein hydrolysates prepared from fish meat fermented by Bacillus subtilis A26. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 6, p. 963–972, 2014.

JUMERI; KIM, S. M. Antioxidant and anticancer activities of enzymatic hydrolysates of solitary tunicate (*Styela clava*). **Food Science and Biotechnology**, v. 20, n. 4, p. 1075–1085, 2011.

KECHAOU, E. S.; DUMAY, J.; DONNAY-MORENO, C.; JAOUEN, P.; GOUYGOU, J. P.; BERGÉ, J. P.; AMAR, R. BEN. Enzymatic hydrolysis of cuttlefish (*Sepia officinalis*) and sardine (*Sardina pilchardus*) viscera using commercial proteases: Effects on lipid distribution and amino acid composition. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 107, n. 2, p. 158–164, 2009.

KIM, E. K.; JOUNG, H. J.; KIM, Y. S.; HWANG, J. W.; AHN, C. B.; JEON, Y. J.; MOON, S. H.; SONG, B. C.; PARK, P. J. Purification of a novel anticancer peptide from enzymatic hydrolysate of Mytilus coruscus. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 10, p. 1381–1387, 2012.

KIM, E. K.; KIM, Y. S.; HWANG, J. W.; LEE, J. S.; MOON, S. H.; JEON, B. T.; PARK, P. J. Purification and characterization of a novel anticancer peptide derived from Ruditapes philippinarum. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 7, p. 1086–1090, 2013.

KOBBI, S.; NEDJAR, N.; CHIHIB, N.; BALTI, R.; CHEVALIER, M.; SILVAIN, A.; CHAABOUNI, S.; DHULSTER, P.; BOUGATEF, A. Synthesis and antibacterial activity of new peptides from Alfalfa RuBisCO protein hydrolysates and mode of action via a membrane damage mechanism against Listeria innocua. **Microbial Pathogenesis**, v. 115, p. 41–49, 2018.

KUPPUSAMY, A.; ULAGESAN, S. Antimicrobial activity of protein hydrolysate from marine molluscs babylonia spirata (*Linnaeus, 1758).* **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 6, n. 7, p. 73–77, 2016.

LIASET, B.; ESPE, M. Nutritional composition of soluble and insoluble fractions obtained by enzymatic hydrolysis of fish-raw materials. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 1, p. 42–48, 2008.

LIU, Y.; LI, X.; CHEN, Z.; YU, J.; WANG, F.; WANG, J. Characterization of structural and functional properties of fish protein hydrolysates from surimi processing by-products. **Food Chemistry**, v. 151, p. 459–465, 2014.

MA, S.; HUANG, D.; ZHAI, M.; YANG, L.; PENG, S.; CHEN, C.; FENG, X.; WENG, Q.; ZHANG, B.; XU, M. Isolation of a novel bio-peptide from walnut residual protein inducing apoptosis and autophagy on cancer cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 1, p. 1–14, 2015.

MARTINS, V. G.; COSTA, J. A. V.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Hidrolisado protéico de pescado obtido por vias química e enzimática a partir de corvina (*Micropogonias furnieri*). **Quimica Nova**, v. 32, n. 1, p. 61–66, 2009.

MENDONÇA DINIZ, F.; MARTIN, A. M. Influence of process variables on the hydrolysis of shark muscle protein. **Food Science and Technology International**, v. 4, n. 2, p. 91–98, 1998.

MORRIS, S. J. Arginine metabolism in vascular biology and disease. **Vascular Medicine**, v. 10, p. S83–S87, 2005.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytoxicity assays. **Journal Immunology Methods**, v. 65, p. 55–63, 1983.

NAJAFIAN, L.; BABJI, A. S. A review of fish-derived antioxidant and antimicrobial peptides: Their production, assessment, and applications. **Peptides**, v. 33, n. 1, p. 178–185, 2012.

NGO, D. H.; RYU, B.; KIM, S. K. Active peptides from skate (*okamejei kenojei*) skin gelatin diminish angiotensin-i converting enzyme activity and intracellular free radical-mediated oxidation. **Food Chemistry**, v. 143, p. 246–255, 2014.

PAN, X.; ZHAO, Y. Q.; HU, F. Y.; CHI, C. F.; WANG, B. Anticancer activity of a hexapeptide from skate (*Raja porosa*) cartilage protein hydrolysate in HeLa cells. **Marine Drugs**, v. 14, n. 8, p. 1–11, 2016.

PIHLANTO-LEPPÄLÄ, A. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: Opioid and ace-inhibitory peptides. **Trends in Food Science and Technology**, v. 11, n. 9–10, p. 347–356, 2000.

PIOTROWICZ, I. B. B.; MELLADO, M. M. S. Antioxidant hydrolysates production from Argentine anchovy (*Engraulis anchoita*) with different enzymes. **International Food Research Journal**, v. 22, n. 3, p. 1203–1211, 2015.

POWERS, J. P.; HANCOCK, R. E. The relationship between peptide structure and bacterial Activity. **Peptides**, v. 24, p. 1681–1691, 2003.

RADEK, K.; GALLO, R. Antimicrobial peptides: Natural effectors of the innate immune system. **Seminars in Immunopathology**, v. 29, n. 1, p. 27–43, 2007.

RAJABZADEH, M.; POURASHOURI, P.; SHABANPOUR, B.; ALISHAHI, A. Amino acid composition, antioxidant and functional properties of protein hydrolysates from the roe of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **International Journal of Food Science and Technology**, v. 53, p. 313–319, 2018.

RAJANBABU, V.; CHEN, J. Applications of antimicrobial peptides from fish and perspectives for the future. **Peptides**, p. 411–415, 2011.

SAH, B. N. P.; VASILJEVIC, T.; MCKECHNIE, S.; DONKOR, O. N. Identification of anticancer peptides from bovine milk proteins and their potential roles in management of cancer: A critical review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 14, n. 2, p. 123–138, 2015.

SALEM, R. B. S.; BKHAIRIA, I.; ABDELHEDI, O.; NASRI, M. Octopus vulgaris protein hydrolysates : characterization , antioxidant and functional properties. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 6, p. 1442–1454, 2017.

SBROGGIO, M. F.; MONTILHA, M. S.; FIGUEIREDO, V. R. G. DE; GEORGETTI, S. R.; KUROZAWA, L. E. Influence of The Degree of Hydrolysis and Type of Enzyme on Antioxidant Activity of Okara Protein Hydrolysates. **Food Science and Technology**, v. 36, n. 2, p. 375–381, 2016.

SEDAGHATI, M.; EZZATPANAH, H.; BOOJAR, M. M. A.; EBRAHIMI, M. T.; AMINAFSHAR, M. Plasmin-digest of β-lactoglobulin with antibacterial properties. **Food and Agricultural Immunology**, v. 8, p. 218–230, 2015.

SEDAGHATI, M.; EZZATPANAH, H.; BOOJAR, M. M. A.; TAJABADI, M. Plasmin digest of κ-casein as a source of antibacterial peptides. **Journal of Dairy Research**, v. 8, p. 245–251, 2014.

SEDAGHATI, M.; EZZATPANAH, H.; MASHHADI AKBAR BOOJAR, M.; TAJABADI EBRAHIMI, M.; KOBARFARD, F. Isolation and identification of some antibacterial peptides in the plasmin-digest of β-casein. **LWT - Food Science and Technology**, v. 68, p. 217–225, 2016.

SERRA, I.; SCORCIAPINO, M. A.; MANZO, G.; CASU, M.; RINALDI, A. C.; ATTOUB, S.; MECHKARSKA, M.; CONLON, J. M. Conformational analysis and cytotoxic activities of the frog skin host-defense peptide, hymenochirin-1Pa. **Peptides**, v. 61, p. 114–121, 2014.

SHAI, Y. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides,. **Biopolymers**, v. 66, p. 236–248, 2002.

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

SILA, A.; HEDHILI, K.; PRZYBYLSKI, R.; ELLOUZ-CHAABOUNI, S.; DHULSTER, P.; BOUGATEF, A.; NEDJAR-ARROUME, N. Antibacterial activity of new peptides from barbel protein hydrolysates and mode of action via a membrane damage mechanism against Listeria monocytogenes. **Journal of Functional Foods**, v. 11, p. 322–329, 2014a.

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, 2014b.

SONG, R.; WEI, R. BIAN; RUAN, G. QIANG; LUO, H. YU. Isolation and identification of antioxidative peptides from peptic hydrolysates of half-fin anchovy (*Setipinna taty*). **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, n. 1, p. 221–229, 2015.

SUWAL, S.; ROBLET, C.; AMIOT, J.; DOYEN, A.; BEAULIEU, L.; LEGAULT, J.; BAZINET, L. Recovery of valuable peptides from marine protein hydrolysate by electrodialysis with ultrafiltration membrane: impact of ionic strength. **Food Research International**, v. 65, n. PC, p. 407–415, 2014.

TANG, W.; ZHANG, H.; WANG, L.; QIAN, H.; QI, X. Targeted separation of antibacterial peptide from protein hydrolysate of anchovy cooking wastewater by equilibrium dialysis. **Food Chemistry**, v. 168, p. 115–123, 2015.

TRINDADE, G. S.; CAPELLA, M. A. M.; CAPELLA, L. S.; AFFONSO-MITIDIER, O. R. RUMJANEK, V. M. Differences in sensitivity to UVC, UVB and UVA radiation of a multidrug-resistant cell line overexpressing P-glycoprotein. **Photochemistry Photobiology**, v. 69, p. 694–699, 1999.

UMAYAPARVATHI, S.; MEENAKSHI, S.; VIMALRAJ, V.; ARUMUGAM, M.; SIVAGAMI, G.; BALASUBRAMANIAN, T. Antioxidant activity and anticancer effect of bioactive peptide from enzymatic hydrolysate of oyster (*Saccostrea cucullata*). **Biomedicine and Preventive Nutrition**, v. 4, n. 3, p. 343–353, 2014.

VENUSTE, M.; ZHANG, X.; SHOEMAKER, C. F.; KARANGWA, E.; ABBAS, S.; KAMDEM, P. E. Influence of enzymatic hydrolysis and enzyme type on the nutritional and antioxidant properties of pumpkin meal hydrolysates. **Food & Function**, v. 4, n. 5, p. 811, 2013.

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, K. RONG; ZHANG, B. ZHI; ZHANG, W.; YAN, J. XI; LI, J.; WANG, R. Antitumor effects, cell selectivity and structure-activity relationship of a novel antimicrobial peptide polybia-MPI. **Peptides**, v. 29, n. 6, p. 963–968, 2008.

WANG, N.; WANG, W.; LIU, X.; LIU, C.; JIANCANG, J.; LU, Y. Purification and Characterization of Antiproliferative Peptide from Enzymatic Hydrolysates of Chinese Soft-Shelled Turtle Protein. p. 209–214, 2018.

WATFORD, M. Glutamine and glutamate: Nonessential or essential amino acids? **Animal Nutrition**, v. 1, n. 3, p. 119–122, 2015.

WHITE, J. A.; FRY, J. C.; HART, R. J. An Evaluation of the Waters Pico Tag System for the Amino Acid Analysis of Food Materials. **Journal of Automatic Chemistry**, v. 8, n. 4, p. 170–177, 1986.

WHO/FAO/UNU EXPERT CONSULTATION. Protein and amino acid requirements in human nutrition. **World Health Organization technical report series**, n. 935, p. 1–265, 2007.

YU, W.; FIELD, C. J.; WU, J. Purification and Identification of Anti-inflammatory Peptides from Spent Hen Muscle Proteins Hydrolysate. **Food Chemistry**, n. 253, p. 101-107, 2018.

ZAMORA-SILLERO, J.; RAMOS, P.; MONSERRAT, J. M.; PRENTICE, C. Evaluation of the Antioxidant Activity In Vitro and in Hippocampal HT-22 Cells System of Protein Hydrolysates of Common Carp (*Cyprinus carpio*) By-Product. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 27, n. 1, p. 21–34, 2018.

ARTIGO III

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTI-HIPERTENSIVA APRESENTADA POR PEPTÍDEOS DE CAMARÃO BRANCO (*LITOPENAEUS VANNAMEI*)

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial antioxidante e anti-hipertensivo apresentado por diferentes frações peptídicas de camarão branco *(Litopenaeus vannamei)*. Os hidrolisados proteicos de camarão branco foram obtidos por hidrólise enzimática utilizando Alcalase e Protamex até atingir grau de hidrólise de 10% e 20%. As frações peptídicas foram obtidas a partir de hidrolisados proteicos de camarão branco mediante ultrafiltração utilizando membranas com tamanho de 10 e 3 kDa. A atividade antioxidante das frações peptídicas foi avaliada para as três frações peptídicas (>10 kDa, 3-10 kDa e <3 kDa). Para medir a atividade anti-hipertensiva foram utilizadas as frações com tamanho molecular menor que 3 kDa. Os resultados encontrados indicaram que o grau de hidrólise influenciou na distribuição da massa molecular das frações péptidicas de camarão, um menor grau de hidrólise resultou em maior concentração de peptídeos > 10 kDa. Em geral, a massa molecular das frações influenciou na atividade antioxidante, as frações com tamanho menor que 3 kDa apresentaram elevada capacidade de sequestro do radical DPPH, enquanto que as frações peptídicas com tamanho maior que 10 kDa apresentaram maior poder redutor. Entretanto, para captura do radical ABTS foram observadas elevada capacidade antioxidante para ambas as frações. Com relação ao efeito anti-hipertensivo, as frações obtidas com Alcalase apresentaram maior efeito inibitório sobre a enzima conversora de angiotensina. Os resultados encontrados indicam que as frações peptídicas de camarão apresentaram efeito antioxidante e anti-hipertensivo.

Palavras-Chave: Bioatividade. Crustáceo. Ultrafiltração. Massa molecular.

1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares são responsáveis por elevadas taxas de mortalidade, representando globalmente 17,5 milhões no ano de 2012 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016). A pressão arterial elevada é um fator de risco para as doenças cardiovasculares, sendo responsável pela maioria das mortes evitáveis a nível mundial (KEARNEY et al., 2005; MOHAMED, 2014).

A enzima conversora da angiotensina-I (ECA) exerce um importante papel fisiológico no controle da pressão arterial ao converter a angiotensina I na angiotensina II (vasoconstritor) e ao inativar um potente vasodilatador da bradicinina aos seus fragmentos inativos (LAFARGA; HAYES, 2017). Inibidores de ECA sintéticos como captopril, lisinopril e enalapril geralmente são utilizados para o controle da pressão arterial apesar dos efeitos colaterais, tais como tosse, tonturas, dor de cabeça, entre outros (VERMEIRSSEN; VAN CAMP; VERSTRAETE, 2002).

Estudos recentes na área proteômica indicam o uso dos peptídeos como agentes terapêuticos capazes de aliviar os fatores de risco relacionados à hipertensão arterial (SAADI et al., 2015a). Os peptídeos anti-hipertensivos são tipicamente produzidos a partir de proteínas naturais via hidrólise enzimática através da utilização de diferentes tipos de enzimas proteolíticas (WU; LIAO; UDENIGWE, 2017). Esses peptídeos geralmente têm sua atividade melhorada, quando concentrados através da técnica de ultrafiltração por membranas, após o processo de hidrólise (NWACHUKWU et al., 2014; ROSLAN et al., 2017). A ultrafiltração é uma técnica de separação que baseia-se no tamanho molecular e tem sido amplamente aplicada para concentrar as frações específicas de hidrolisados proteicos através da utilização de membranas (CENTENARO et al., 2014; LASSOUED et al., 2015; ROSLAN et al., 2018). O processo de ultrafiltração por membranas permite concentrar peptídeos de tamanho específico, sem aplicação de calor ou utilização de produtos tóxicos (ZHU et al., 2016).

Assim como os peptídeos anti-hipertensivos, os peptídeos antioxidantes estão sendo fracionados mediante células de ultrafiltração para melhor compreensão da sua bioatividade (JANG; LICEAGA; YOON, 2016). Pesquisas relacionam que peptídeos antioxidantes podem atuar sobre o controle de doenças cardiovasculares, uma vez que esses compostos possuem a capacidade de captura de radicais livres. Os radicais livres são moléculas instáveis e reagem facilmente com carboidratos, polímeros, lipídeos insaturados, DNA e RNA no corpo humano. Essas interações podem levar a ocorrência de numerosas doenças crônicas, como Alzheimer,

diabetes, doenças cardiovasculares, distúrbios neurodegenerativos e câncer (ARUOMA, 1998; BUTTERFIELD et al., 2002; JANG; LICEAGA; YOON, 2016; YANG et al., 2007). Além dos benefícios associados a prevenção de doenças, os peptídeos antioxidantes possuem a capacidade de prolongar a vida útil dos alimentos, inibindo reações de oxidação lipídica que reduzem a qualidade dos mesmos (SARMADI; ISMAIL, 2010). A atividade antioxidante e anti-hipertensiva dos peptídeos bioativos depende de diferentes fatores, dentre eles estão tamanho molecular e fonte proteica (VILLAMIL; VÁQUIRO; SOLANILLA, 2017).

Diferentes fontes proteicas já foram utilizadas para obtenção de peptídeos bioativos (CENTENARO et al., 2014; CENTENARO; MELLADO; PRENTICE-HERNÁNDEZ, 2011; COELHO; SALAS-MELLADO, 2017; DOS SANTOS et al., 2011; FONSECA et al., 2017; JAIN; ANAL, 2017; SILVA; FONSECA; PRENTICE, 2014; TAVARES et al., 2012). Simpson et al. (1998) sugerem que as espécies de crustáceos, como camarão, caranguejo, lagosta, apresentam elevado potencial para obtenção de compostos bioativos por apresentarem uma importante fonte de aminoácidos, peptídeos, proteínas e outros produtos bioquímicos que podem ser destinados para diferentes aplicações.

Diante disso, o objetivo do trabalho foi avaliar a atividade antioxidante e anti-hipertensiva apresentada por frações peptídicas de camarão branco *(Litopenaeus vannamei)*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

2.1.1 Matéria-prima

A matéria-prima utilizada no trabalho foi da classe Crustácea, Família *Penaeidae,* pertencente ao gênero *Penaeus* denominada de Camarão Branco *(Litopenaeus vannamei)*. A espécie foi cultivada com o sistema da tecnologia de bioflocos (BFT) e foi obtida mediante doação pela Estação Marinha de Aquicultura (EMA) pertencente a Universidade Federal do Rio Grande (FURG), localizada no Bairro Querência, Balneário Cassino, no município de Rio Grande, RS, Brasil.

2.1.2 Enzimas e Reagentes

As proteases utilizadas no trabalho foram Alcalase 2,4 L e Protamex, produzidas pela Novozymes Latina Americana Ltda e Sigma Aldrich, respectivamente. ABTS (2,2´-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico), DPPH (2,2-diphenil-1-picryl-hidrazil), HHL (hipuril-histidil-leucina) e a enzima conversora da angiotensina - I (ECA) foram adquiridos pela Sigma Aldrich.

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Obtenção de hidrolisados proteicos do camarão branco *(Litopenaeus vannamei)*

Os hidrolisados proteicos foram obtidos a partir da hidrólise enzimática das proteínas presentes no músculo do camarão branco pela adição das enzimas Alcalase e Protamex, em separado. O processo de hidrólise foi realizado em reator de parede de vidro termostatizado mantido sob condições ótimas de pH e temperatura para cada enzima (Alcalase (pH 8, 50 ºC) e Protamex (pH 7, 50 ºC)). A proporção de músculo e água foi mantida em 1:2, enquanto que a enzima foi adicionada em 1% em relação a massa de músculo. O grau de hidrólise (GH) foi monitorado até que atingisse GH de 10 e 20% (ADLER-NISSEN, 1986). Atingindo o GH desejado, a hidrólise foi interrompida pela inativação das enzimas, mediante aquecimento a 90 ºC durante 20 min. Em seguida, um processo de centrifugação foi empregado para separação das proteínas solubilizadas das insolúveis, nas condições de 14000 *x* g durante 20 min a 4 ºC. A fração insolúvel foi descartada, enquanto que a fração solúvel (proteína hidrolisada) foi submetida ao congelamento em ultrafreezer (-80 ºC), seguida de um processo de liofilização (-55 °C/50 μHg) em liofilizador (Liotop L108, São Carlos, Brasil). Após liofilização, os hidrolisados proteicos de camarão secos foram armazenados em frascos de vidro e mantidos em freezer doméstico (-18 ºC) (ALEMÁN et al., 2011; LIU et al., 2014; NGO; RYU; KIM, 2014).

2.2.2 Ultrafiltração

Os hidrolisados proteicos foram fracionados utilizando células de ultrafiltração (Advantec, UHP-76) com agitação magnética, capacidade de 300 mL acoplados a um cilindro

de nitrogênio segundo metodologia descrita por Centenaro et al. (2014). Para realização do fracionamento, uma suspensão contendo 0,75% de hidrolisado em água ultrapura foi ultrafiltrada em membranas de ultrafiltração de celulose regenerada com 76 mm de diâmetro e massa molar de corte de 10 kDa e 3 kDa. Durante cada processo de filtração foi aplicada uma pressão de 60 psi com gás nitrogênio. As frações peptídicas obtidas foram divididas em três grupos: F1 (>10 kDa), F2 (3-10 kDa) e F3 (<3 kDa). Todas as frações foram congeladas, liofilizadas (Liotop L108, São Carlos, Brasil), e armazenadas à temperatura de -18 ºC para posteriores análises. O grau de distribuição da massa molecular foi expresso como a porcentagem relativa de cada rendimento.

2.2.3 Avaliação da Atividade Antioxidante

A avaliação da atividade antioxidante das frações peptídicas de camarão foi realizada para as três frações peptídicas (F1:>10 kDa, F2: 3-10 kDa e F3: <3 kDa), mediante três análises: sequestro do radical livre DPPH, poder redutor e captura do radical livre $ABTS^{\cdot+}$.

2.2.3.1 Sequestro do Radical Livre DPPH

A capacidade de sequestro do radical livre DPPH apresentada pelas frações peptídicas foi avaliada de acordo com metodologia descrita por Cheng, Moore e Yu (2006). Para realização da análise, adicionou-se 500 µL de amostra a 500 µL de DPPH 0,1 $mmol.L^{-1}$ em 95% etanol. Em seguida, a mistura foi homogeneizada em *vórtex* durante 5 s e mantida em repouso durante 30 minutos sob temperatura ambiente com ausência de luz. A absorbância da solução foi medida a 517 nm em espectrofotômetro. A capacidade de sequestro do radical livre DPPH das frações peptídicas foi expressa em percentual (%), de acordo a Equação 1. Foram estudadas diferentes concentrações de frações peptídicas (2,5; 5,0 e 7,5 $mg.mL^{-1}$).

$$\% \text{ Sequestro do Radical DPPH} = \frac{(A_{controle} - A_{amostra})}{A_{controle}} \times 100 \quad (1)$$

Onde $A_{controle}$ é a absorbância sem amostra e $A_{amostra}$ é a absorbância com amostra.

2.2.3.2 Poder Redutor

O poder redutor apresentado pelas frações peptídicas de camarão branco foi determinado pelo método de Zhang; Wang; Xu, (2008). Uma solução contendo 250 µL de amostra (250 $mg.mL^{-1}$), 250 uL de tampão fosfato 0,02 $mol.L^{-1}$ (pH 6,6) e 2 mL de ferricianeto de potássio 1% (p/v) foi incubada a 50 ºC durante 20 min. Após a incubação, foram adicionados 2 mL de de ácido tricloroacético 10% (TCA) e a mistura reacional foi homogeneizada em *vórtex* durante 2 s. Uma alíquota do sobrenadante (500 µL) de cada mistura de amostra foi misturada com 400 uL de água destilada e 100 uL de cloreto férrico 0,1%. Após o tempo de reação de 10 min, a absorbância das soluções resultantes foi medida a 700 nm em espectrofotômetro. Uma maior absorbância da mistura de reação indicou maior poder redutor apresentado pela fração peptídica estudada.

2.2.3.3 Captura do radical $ABTS^{\cdot+}$

A avaliação da captura do radical livre $ABTS^{\cdot+}$ apresentada pelas frações peptídicas de camarão branco foi realizada de acordo com método descrito por Chi et al. (2015). Para realização do teste uma solução mãe do radical ABTS contendo 7mM ABTS com 2,45 mM persulfato de potássio foi preparada e mantida a temperatura ambiente com ausência de luz durante 16 h. Uma alíquota da solução mãe foi diluída com álcool etílico até atingir uma absorbância mensurada de 0,700 ± 0,05 a 734 nm em espectrofotômetro (solução trabalho de ABTS). Uma alíquota de 600 µL das amostras foi misturada com 400 µL de solução trabalho de ABTS e mantida em repouso à temperatura ambiente com ausência de luz durante 10 min. Os valores de absorbância foram lidos a 734 nm utilizando um espectrofotômetro UV-1601 (Modelo CPS-240, Shimadzu, Japão). A captura do radical $ABTS^{\cdot+}$ foi calculada em percentual (%) de acordo com a Equação 2. Foram estudadas três concentrações de frações peptídicas (2,5; 5,0 e 7.5 $mg.mL^{-1}$).

$$ABTS^{+}(\%) = \left[\frac{(A_{controle} - A_{amostra})}{A_{controle}}\right] \times 100\ \% \qquad (2)$$

Onde $A_{controle}$ é a absorbância sem amostra e $A_{amostra}$ é a absorbância com amostra.

2.2.4 Avaliação da Atividade Anti-hipertensiva

As frações peptídicas com tamanho molecular menor que 3 kDa, foram avaliadas como peptídeos inibidores da enzima conversora da angiotensina (ECA), segundo o método desenvolvido por Cushman e Cheung (1971), Lahogue et al. (2010) e Wu (2002) com modificações. Um volume de 20 µL de amostra (0,1; 0,5; 1,0 e 2,0 $mg.mL^{-1}$) foi adicionado a 50 µL de HHL (5 mM) e 160 µL de ECA (0,025 U.mL-^{1}) e incubado a 37 ºC em banho termostatizado durante 30 min. A reação foi interrompida pela adição de 100 µL de ácido clorídrico (0,1 M). Após o tempo reacional, as amostras foram centrifugadas a 1000 *x* g por 10 min. A quantidade de produto liberado, ou seja, o ácido hipúrico (AH) formado na reação enzimática foi analisada através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). Alíquotas de 50 µL solução reacional foram injetadas em coluna C18 (Zorbax, Eclipse XDB) (4,6 x 150 mm; 5 µm) e monitoradas por absorbância a 228 nm. A coluna foi eluída a uma taxa de fluxo de 0,7 $mL.min^{-1}$ com duas misturas de solventes A (0,05% de ácido trifluoroacético em água) e B (0,05% ácido trifluoroacético em acetonitrila grau HPLC). Os tempos de reação de formação de AH e HHL foram 10,5 e 12,5 min, respectivamente. As amostras analisadas foram diluídas em tampão borato de sódio (0,1M) pH 8,3 contendo 0,3 M de cloreto de sódio (NaCL). A capacidade das amostras em inibirem a ECA próximo a 100%, indica que ocorreu total inibição.

2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O tratamento dos dados foi realizado utilizando software *Statística* 5.0, nos módulos de análise de variância (ANOVA) e teste de comparação de médias de Tukey ao nível de 5% de significância ($p<0,05$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ULTRAFILTRAÇÃO

A distribuição da massa molecular dos hidrolisados proteicos de camarão branco, obtida mediante ultrafiltração com membranas de massa molar de corte de 10 kDa e 3 kDa, apresentada na Tabela 1 indica, de maneira geral, que um menor grau de hidrólise resultou em

maior quantidade de peptídeos de tamanhos >10 kDa e 3-10 kDa, enquanto que para os maiores graus de hidrólise há maior quantidade de frações peptídicas de tamanho <3 kDa. Comportamento semelhante foi reportado por Jang, Liceaga e Yoon (2016), que indica que um maior grau de hidrólise permite uma maior quebra da estrutura proteica e, consequentemente, uma maior quantidade de compostos de baixa massa molecular.

Tabela 1 – Distribuição da massa molecular (%) dos hidrolisados proteicos de camarão branco com diferentes GH mediante ultrafiltração com membranas de 10 kDa e 3 kDa

Hidrolisados	Distribuição da Massa Molecular (%)		
	F1	F2	F3
A10	$37,3 \pm 4,6^{a}$	$7,3 \pm 0,93^{b}$	$55,3 \pm 4,2^{b}$
A20	$18,1 \pm 4,9^{b}$	$4,0 \pm 0,4^{b}$	$77,6 \pm 5,4^{a}$
P10	$14,3 \pm 4,5^{b}$	$29,4 \pm 4,0^{a}$	$56,4 \pm 4,7^{b}$
P20	$33,3 \pm 2,5^{a}$	$5,4 \pm 2,2^{b}$	$61,3 \pm 2,3^{b}$

A10: Hidrolisados proteicos de camarão com GH de 10% utilizando Alcalase; A20: Hidrolisados proteicos de camarão com GH de 20% utilizando Alcalase; P10: Hidrolisados proteicos de camarão com GH de 10% utilizando Protamex; P20: Hidrolisados proteicos de camarão com GH de 20% utilizando Protamex; F1: >10 kDa, F2: 3-10 kDa, F3: < 3 kDa; os resultados são expressos como média ± desvio padrão; Letras iguais na mesma coluna, indicam que não há diferença significativa ($p > 0,05$).

A distribuição da massa molecular dos hidrolisados proteicos com diferentes GH apresentou-se em diferentes proporções, indicando que a especificidade de quebra de cada enzima e grau de hidrólise resulta em diferenças no tamanho da cadeia e essas diferenças podem influenciar nas propriedades bioativas apresentadas pelas frações peptídicas.

Os hidrolisados proteicos obtidos utilizando a enzima Alcalase com GH de 20% apresentaram maior concentração de peptídeos com massa molecular inferior a 3 kDa. He et al. (2013) relatram que a Alcalase é considerada uma protease eficaz para liberar peptídeos de baixa massa molecular.

3.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

As propriedades antioxidantes dos peptídeos são avaliadas através de uma variedade de métodos. Entre os diferentes métodos, geralmente são utilizados aqueles que avaliam a capacidade de compostos antioxidantes para eliminar os radicais livres e o poder de redução férrica. A literatura não indica um método padrão, embora haja vários métodos

conhecidos (BORAWSKA et al., 2016; SARMADI; ISMAIL, 2010). Assim, a atividade antioxidante apresentada pelas frações peptídicas foi avaliada através de diferentes métodos.

3.2.1 Sequestro do Radical Livre DPPH

DPPH é um radical que aceita um elétron ou um átomo de hidrogênio de compostos bioativos para se tornar uma molécula menos reativa e mais estável (FARVIN et al., 2014). A metodologia de sequestro de radical livre DPPH geralmente é utilizada por ser um método rápido, conveniente e eficiente para avaliar a atividade de antioxidante de um composto através da capacidade de captura do radical livre (XIE et al., 2008). O radical DPPH possui absorbância a 517 nm, e a mesma reduz gradualmente à medida que os radicais livres são eliminados e a intensidade da coloração etanólica contendo o radical e a amostra muda de violeta apara amarelo, devido à formação da forma não radical DPPH-H pela reação (CHI et al., 2014; KAMAU; LU, 2011; XIE et al., 2008).

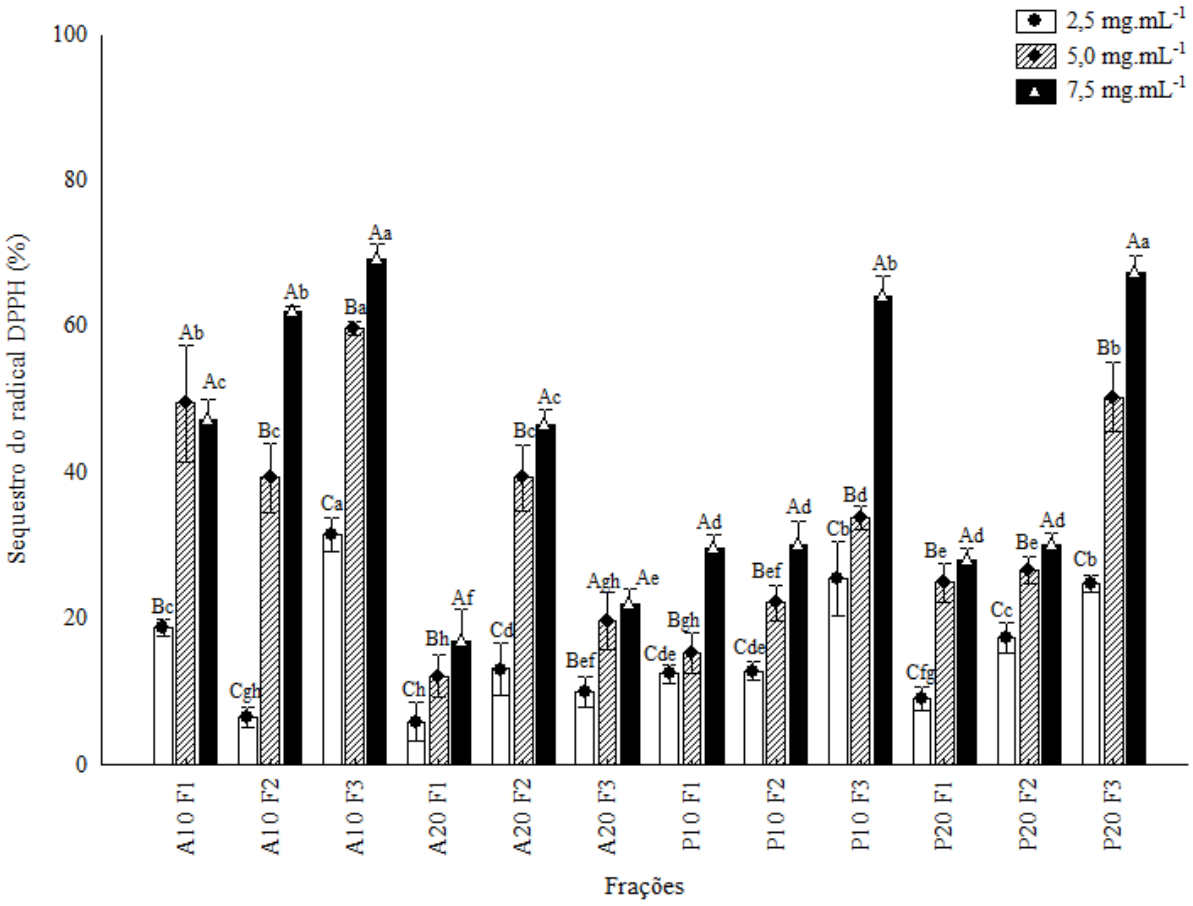
A Figura 1 apresenta a capacidade de sequestrar o radical livre DPPH apresentada pelas diferentes frações peptídicas de camarão branco. A atividade de sequestro do radical livre DPPH foi significativamente diferente, de maneira geral, entre as frações peptídicas, indicando que os peptídeos de tamanho variável apresentam atividade antioxidante pelo método de DPPH, sabendo que quanto maior a atividade de sequestro do radical, maior será a sua atividade antioxidante.

Os resultados indicam que para esta análise, as amostras apresentaram um comportamento dose dependente, onde de maneira geral, um acréscimo na concentração permitiu uma maior capacidade de sequestro do radical DPPH pelas frações. Diferentes autores reportam comportamento semelhante quando verificaram a capacidade de sequestro do radical DPPH apresentada por diferentes frações peptídicas (BKHAIRIA et al., 2016; CENTENARO et al., 2014; CHI et al., 2015).

Observando os resultados (Figura 1) percebe-se que as frações com menor massa molecular (F3 <3 kDa) apresentaram maior atividade antioxidante para todas as amostras, com exceção da fração peptídica com massa molecular entre 3-10 kDa e GH de 20% utilizando Alcalase (A20F2). A elevada atividade antioxidante apresentada pelas frações F3 é devida ao sua baixa massa molecular, pois quanto menor o tamanho maior a facilidade para interagir com o radical livre, uma vez que essas frações apresentam um maior conteúdo de aminoácidos livres que possuem elevada capacidade de interação com o radical DPPH (FARVIN et al., 2016). Nossos resultados corroboram com Jang, Liceaga e Yoon (2016) que purificaram e

caracterizaram peptídeos derivados de hidrolisados de proteicos de pescado de areia (*Arctoscopus japonicus*) e verificaram que as frações < 3kDa apresentaram maior atividade de sequestro do radical livre DPPH.

Figura 1 - Atividade sequestradora de radical livre DPPH (%) apresentada pelas frações peptídicas de camarão branco, com diferentes GH, obtidos pelas enzimas Alcalase e Protamex



A10F1: Fração peptídica (> 10kDa) de camarão com GH de 10% utilizando Alcalase, A10F2: Fração peptídica (3-10kDa) de camarão com GH de 10% utilizando Alcalase, A10F3: Fração peptídica (< 3kDa) de camarão com GH de 10% utilizando Alcalase, A20F1: Fração peptídica (> 10kDa) de camarão com GH de 20% utilizando Alcalase, A20F2: Fração peptídica (3-10kDa) de camarão com GH de 20% utilizando Alcalase, A20F3: : Fração peptídica (< 3kDa) de camarão com GH de 20% utilizando Alcalase, P10F1: Fração peptídica (>10kDa) de camarão com GH de 10% utilizando Protamex, , P10F2: Fração peptídica (3-10kDa) de camarão com GH de 10% utilizando Protamex, P10F3: Fração peptídica (<3kDa) de camarão com GH de 10% utilizando Protamex, P20F1: Fração peptídica (> 10kDa) de camarão com GH de 20% utilizando Protamex, P20F2: Fração peptídica (3-10kDa) de camarão com GH de 20% utilizando Protamex, P20F3: Fração peptídica (<3kDa) de camarão com GH de 20% utilizando Protamex. Letras maiúsculas iguais para mesma fração, indicam que não há diferença significativa entre as concentrações ($p > 0,05$); Letras minúsculas iguais para a mesma concentração, indicam que não há diferença significativa entre as frações ($p > 0,05$).

Para todas as concentrações, a fração A10F3 apresentou atividade antioxidante superior com relação as demais frações, com exceção na concentração 7,5 mg.mL^{-1}, onde não

foi observado diferença significativa entre A10F3 e P20F3. Esse resultado evidencia que, para essa concentração, o grau de hidrólise ou tipo de enzima utilizado não exerceram influência sobre esta bioatividade. Geralmente, a capacidade de sequestro do radical DPPH é influenciada pela presença de aminoácidos hidrofóbicos que facilitam a interação com radical DPPH (GIRGIH et al., 2013). Assim pode-se se sugerir que as amostras A10F3 e P20F3 apresentam elevado conteúdo de aminoácidos hidrofóbicos. De acordo com Suwal et al. (2018) à medida que a hidrofobicidade aumenta, os peptídeos podem facilmente interagir com o radical DPPH, que apresenta caráter hidrofóbico, aumentando assim o potencial de transferência de elétrons e extinção do radical livre.

Analisando o efeito do grau de hidrólise sobre as frações peptídicas verificou-se que as frações obtidas com Alcalase e GH de 10% apresentaram maior poder antioxidante quando comparadas as frações com Alcalase e GH de 20%, indicando que uma menor extensão da hidrólise com Alcalase confere um maior poder antioxidante para as frações. Entretanto, quando a enzima Protamex foi utilizada, as frações com maior grau de hidrólise (P20) apresentaram maior poder antioxidante em relação a (P10), indicando que não é possível estabelecer uma relação entre o GH e capacidade de sequestro do radical DPPH apresentada pelas frações peptídicas. Comportamento semelhante foi observado por Kamau e Lu (2011) que apontaram que apesar do GH influenciar no tamanho, a atividade antioxidante pode ser atribuída pela sequência aminoacídica apresentada pelas frações.

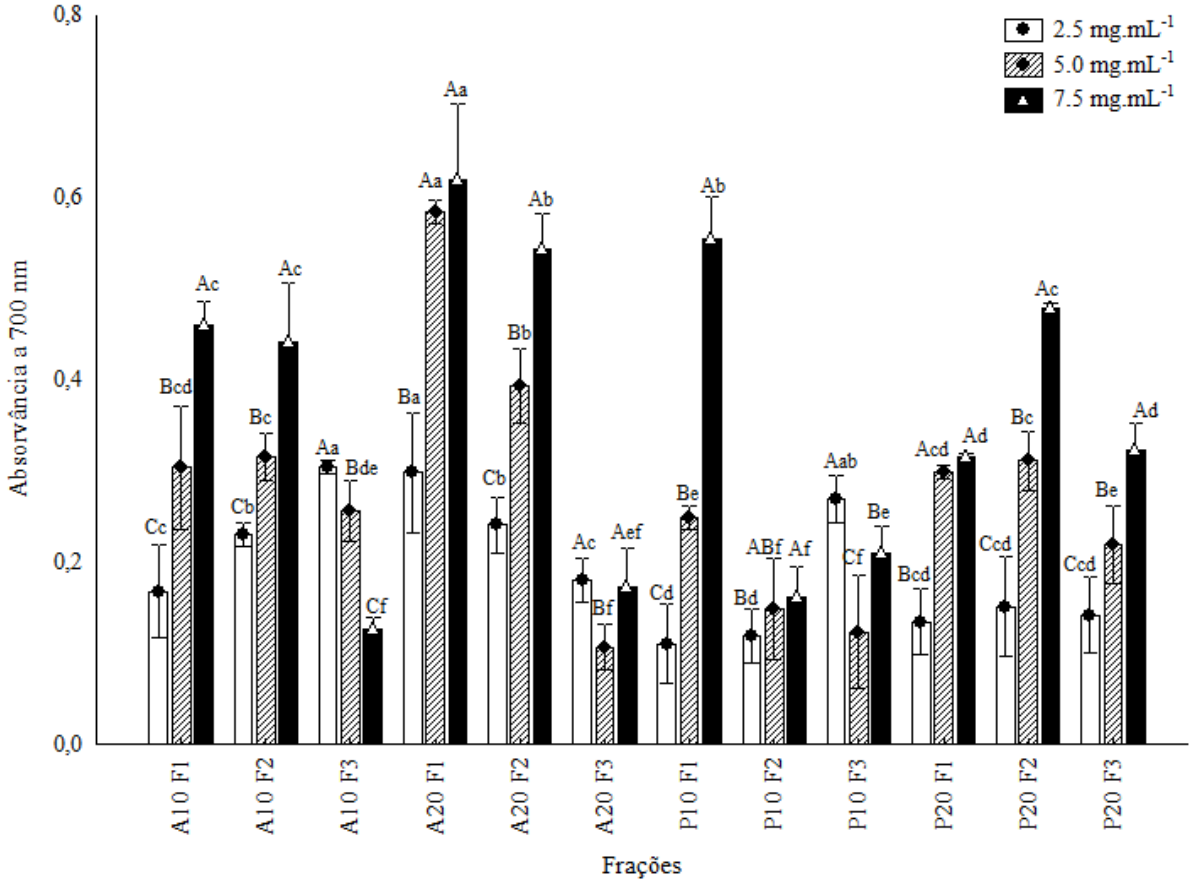
3.2.2 Poder Redutor

O poder redutor é um método amplamente utilizado para avaliar a capacidade de um composto antioxidante em doar um elétron ou um átomo de hidrogênio para reduzir o Fe^{+3} a Fe^{+2} (SAIDI et al., 2014). Este método baseia-se no princípio do aumento da absorção das misturas de reação, onde o aumento da absorbância indica um aumento na atividade antioxidante a 700 nm (ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2013). A Figura 2 apresenta o poder redutor apresentado pelas diferentes frações peptídicas de camarão branco a 700 nm.

Observando a Figura 2, é possível verificar que ao contrário dos resultados encontrados pelo método de DPPH, reportados na Figura 1, a fração com maior massa molecular A20F1 foi a que presentou maior poder antioxidante, uma vez que apresentou maior absorbância a 700 nm. Esses resultados sugerem que quanto maior a massa molecular, maior conteúdo de peptídeos doadores de elétrons ou hidrogênio, e consequentemente maior o poder redutor apresentado pela fração. Comportamento semelhante foi relatado por Luo et al. (2018)

que verificaram que as frações com massa molecular >10 kDa provenientes de caracóis marinhos *(Rapana venosa)* apresentaram maior poder de redução.

Figura 2 - Poder redutor apresentado pelas frações peptídicas de camarão branco, com diferentes GH, obtidos pelas enzimas Alcalase e Protamex



A10F1: Fração peptídica (> 10kDa) de camarão com GH de 10% utilizando Alcalase; A10F2: Fração peptídica (3-10kDa) de camarão com GH de 10% utilizando Alcalase; A10F3: Fração peptídica (< 3kDa) de camarão com GH de 10% utilizando Alcalase; A20F1: Fração peptídica (> 10kDa) de camarão com GH de 20% utilizando Alcalase; A20F2: Fração peptídica (3-10kDa) de camarão com GH de 20% utilizando Alcalase; A20F3: Fração peptídica (< 3kDa) de camarão com GH de 20% utilizando Alcalase; P10F1: Fração peptídica (>10kDa) de camarão com GH de 10% utilizando Protamex; P10F2: Fração peptídica (3-10kDa) de camarão com GH de 10% utilizando Protamex; P10F3: Fração peptídica (<3kDa) de camarão com GH de 10% utilizando Protamex; P20F1: Fração peptídica (> 10kDa) de camarão com GH de 20% utilizando Protamex, P20F2; Fração peptídica (3-10kDa) de camarão com GH de 20% utilizando Protamex; P20F3: Fração peptídica (<3kDa) de camarão com GH de 20% utilizando Protamex. Letras maiúsculas iguais para mesma fração, indicam que não há diferença significativa entre as concentrações ($p > 0,05$); Letras minúsculas iguais para a mesma concentração, indicam que não há diferença significativa entre as frações ($p > 0,05$).

Farvin et al. (2016) quando estudaram o fracionamento e a caracterização de peptídeos antioxidantes, verificaram que o poder de redução das suas frações era evidenciado quando as frações continham quantidades significativas dos aminoácidos arginina, tirosina e

fenilalanina. Assim, esse resultado sugere que a fração A20F1 pode apresentar elevada concentração de tais aminoácidos.

Analisando o grau de hidrólise empregado no estudo para as frações hidrolisadas com Alcalase, verificamos que as frações com Alcalase com GH de 20% apresentaram maior poder redutor, de forma isolada, nas concentrações 5 e 7,5 $mg.mL^{-1}$ nas frações F1 e F2, indicando que um maior GH permitiu a liberação de um maior conteúdo de peptídeos capazes de reduzir o ferro. De acordo com Centenaro et al. (2014), um maior GH permite um aumento da disponibilidade de íons hidrogênio produzidos durante a hidrólise proteica.

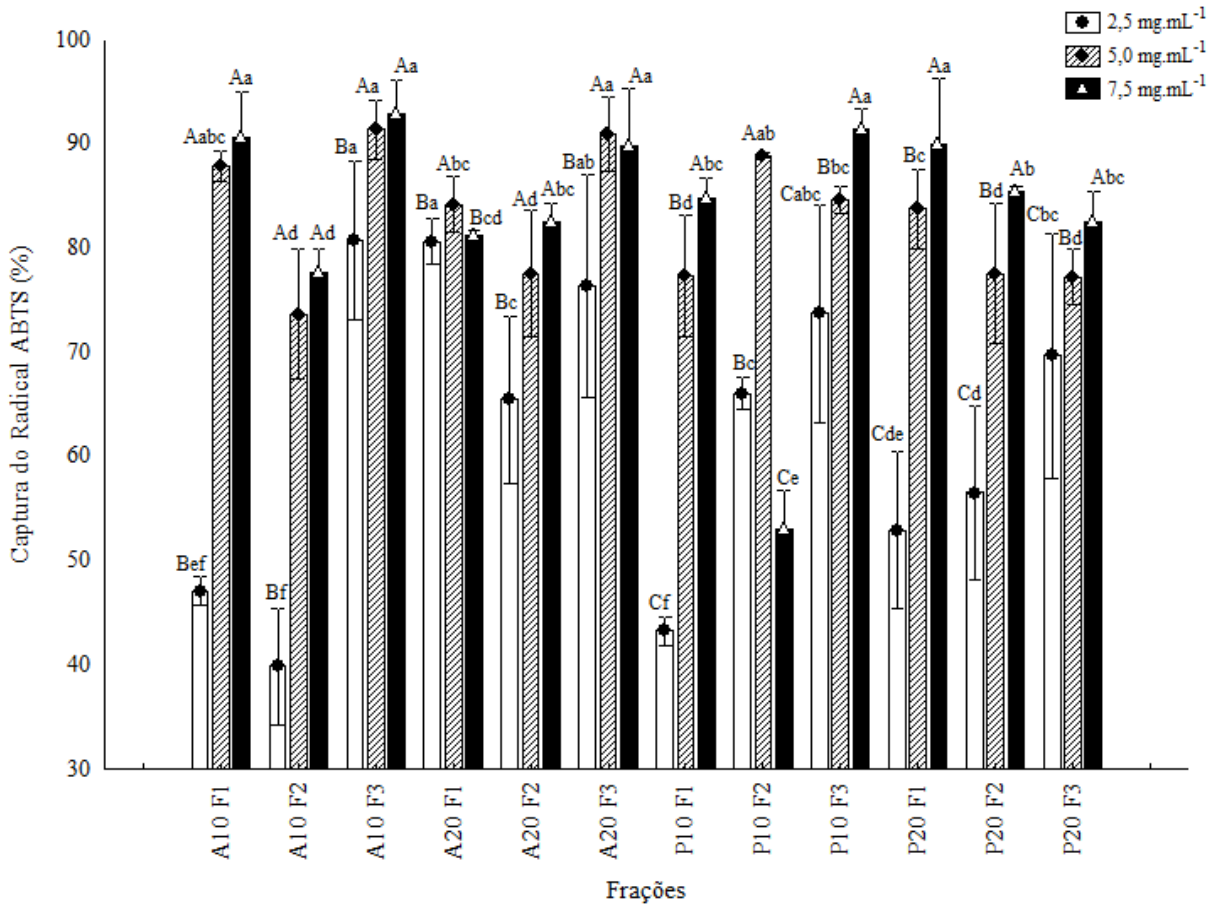
Ainda observando a Figura 2, é possível verificar que para o ensaio de poder redutor não foi evidenciado uma relação de dose dependência para as frações péptidicas de camarão, ao contrário do que é relatado pela literatura (KIMATU et al., 2017; RAZALI; AMIN; SARBON, 2015), indicando que para algumas amostras, maiores concentrações podem ter causado um efeito pró-oxidante.

3.2.3 Captura do radical $ABTS^{\cdot+}$

A atividade antioxidante de diferentes compostos pode ser medida através da metodologia de captura do radical ABTS, que avalia a capacidade do composto em doar um átomo de hidrogênio ao radical, convertendo-o em um produto mais estável (BKHAIRIA et al., 2016). Neste ensaio, o radical ABTS de coloração verde azulado, gerado pela oxidação com persulfato de potássio, é reduzido na presença de antioxidantes, e a extensão da descoloração é determinada a 734 nm em um intervalo de tempo fixo (ZHENG et al., 2016). A Figura 3 apresenta a capacidade de captura do radical livre ABTS apresentada pelas diferentes frações peptídicas de camarão branco.

Analisando a Figura 3, percebeu-se que os resultados encontrados revelaram que para maior concentração (7,5 $mg.mL^{-1}$), as frações A10F1, A10F3, A20F3, P10F3 e P20F1 apresentaram maior atividade antioxidante, a julgar pela maior porcentagem de captura do radical. Os resultados indicam que as frações F2, com massa molecular entre 3-10kDa apresentaram reduzida atividade quando comparada as faixas F1 e F3, com massa molecular >10 kda e <3kda, respectivamente. Dessa forma, pode-se verificar que a atividade antioxidante pelo método de ABTS foi influenciada de certa forma pelo tamanho, independente do GH ou tipo de enzima utilizada no processo de hidrólise.

Figura 3 - Captura do radical livre ABTS (%) apresentada pelas frações peptídicas de camarão branco, com diferentes GH, obtidos pelas enzimas Alcalase e Protamex



A10F1: Fração peptídica (> 10kDa) de camarão com GH de 10% utilizando Alcalase; A10F2: Fração peptídica (3-10kDa) de camarão com GH de 10% utilizando Alcalase; A10F3: Fração peptídica (< 3kDa) de camarão com GH de 10% utilizando Alcalase; A20F1: Fração peptídica (> 10kDa) de camarão com GH de 20% utilizando Alcalase; A20F2: Fração peptídica (3-10kDa) de camarão com GH de 20% utilizando Alcalase; A20F3: Fração peptídica (< 3kDa) de camarão com GH de 20% utilizando Alcalase; P10F1: Fração peptídica (>10kDa) de camarão com GH de 10% utilizando Protamex; P10F2: Fração peptídica (3-10kDa) de camarão com GH de 10% utilizando Protamex; P10F3: Fração peptídica (<3kDa) de camarão com GH de 10% utilizando Protamex; P20F1: Fração peptídica (> 10kDa) de camarão com GH de 20% utilizando Protamex, P20F2; Fração peptídica (3-10kDa) de camarão com GH de 20% utilizando Protamex; P20F3: Fração peptídica (<3kDa) de camarão com GH de 20% utilizando Protamex. Letras maiúsculas iguais para mesma fração, indicam que não há diferença significativa entre as concentrações ($p > 0,05$); Letras minúsculas iguais para a mesma concentração, indicam que não há diferença significativa entre as frações ($p > 0,05$).

Shazly et al. (2017) quando fracionaram e identificaram peptídeos, provenientes de hidrolisados proteicos de búfalo, com elevado potencial antioxidante, verificaram que as frações de menor massa molecular apresentaram maior atividade antioxidante quando analisadas pelo método de ABTS. Entretanto, muitos pesquisadores reportam que a atividade antioxidante dos peptídeos é altamente dependente da sua sequência e composição de aminoácidos (LI et al., 2017). Chen et al. (2012) relataram que a presença de glicina pode contribuir significativamente para a atividade antioxidante, uma vez que o único átomo de

hidrogênio na sua cadeia lateral serve como uma fonte de doação de hidrogênio e neutraliza as espécies ativas de radicais livres. Além disso, Nimalaratne, Bandara e Wu (2015) relataram a glicina pode proporcionar alta flexibilidade a fração peptídica, influenciando positivamente sobre as propriedades antioxidantes. Sendo assim, observando os resultados, as frações com maior atividade antioxidante provavelmente apresentam uma composição elevada de glicina que facilitou a interação com o radical ABTS.

De acordo com Suwal et al. (2018), o potencial antioxidante dos peptídeos é influenciado pela composição e sequência de aminoácidos, massa molecular e hidrofobicidade das frações peptídicas. O radical $ABTS^{+}$ é solúvel em água e solventes orgânicos, utilizado tanto para determinação da capacidade antioxidante compostos hidrofílicos ou lipofílicos. Dessa forma, observando os resultados encontrados na Figura 3, as frações de maior atividade antioxidante possivelmente apresentam uma composição de aminoácidos com caráter hidrofílico ou lipofílico, devido a facilidade de interação apresentada com o radical ABTS.

Entre os métodos utilizados para avaliar a atividade antioxidante das frações peptídicas de camarão, o método de ABTS foi o que apresentou maior sensibilidade, a julgar pelos valores elevados de captura. Muitos estudos relataram que o ensaio ABTS é preferível do que outro método para confirmar a atividade antioxidante de peptídeos para diferentes alimentos, devido à sua sensibilidade, estabilidade e facilidade para gerar o radical na forma de ABTS (BECKER; NISSEN; SKIBSTED, 2004; ZHU et al., 2008).

3.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-HIPERTENSIVA

Os peptídeos bioativos derivados de pescado são amplamente conhecidos pelo seu elevado poder anti-hipertensivo devido à inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) (HERNÁNDEZ-LEDESMA; CONTRERAS; RECIO, 2011; UDENIGWE; ALUKO, 2012; WU; LIAO; UDENIGWE, 2017). A inibição da ECA é influenciada pela massa molecular, estrutura, composição e sequência peptídica (EJIKE et al., 2017).

A massa molecular influencia de forma significativa na atividade anti-hipertensiva apresentada pelos peptídeos (ROSLAN et al., 2017). Muitos trabalhos relatam que peptídeos anti-hipertensivos tem sua bioatividade aumentada quando sua massa molecular é reduzida. Salampessy et al. (2017) isolaram e caracterizaram peptídeos inibitórios de ECA provenientes da espécie *Meuchenia sp*., e observaram que a bioatividade foi significativamente dependente da massa molecular das frações. Valores máximos de inibição eram observados para as frações <5 kDa, enquanto que valores mínimos foram registrados para as frações 5-10 kDa e >10 kDa.

Da mesma forma, Ko et al. (2017) relatam que o fracionamento através de membranas de reduzido tamanho de corte é um método útil para concentrar peptídeos de elevado potencial anti-hipertensivo.

Nesse sentido, para avaliar o efeito inibitório da ECA, foram escolhidas as frações peptídicas de menor massa molecular (F3 <3 kDa) em diferentes concentrações. Como mostrado na Tabela 2, a atividade inibitória aumentou a medida que a concentração de amostra aumentava. Baharuddin, Halim e Sarbon (2016) verificaram comportamento semelhante e, relataram que para todas amostras de proteína hidrolisada de enguia o efeito inibitório obedeceu uma relação dose dependência, sendo que para a maior concentração testada (1mg.mL^{-1}) apresentaram uma percentagem de inibição na ordem de 80 %.

Tabela 2 – Atividade inibitória da enzima conversora da angiotensina (ECA) das frações peptídicas de camarão branco (<3kda) com diferentes GH, obtidos via adição das enzimas Alcalase e Protamex

Fração	Atividade Inibitória da ECA (%)			
	Frações Peptídicas (mg.mL^{-1})			
	0,1	0,5	1,0	2,0
A10F3	36,0^{a} ± 3,9	70,80^{a} ± 6,5	76,8^{a} ± 0,6	86,9^{a} ± 1,8
A20F3	27,4^{b} ± 0,8	62,33^{a} ± 0,7	75,8^{a} ± 1,0	84,9^{ab} ± 0,7
P10F3	30,9^{ab} ± 0,2	65,06^{a} ± 0,4	66,5^{b} ± 0,2	81,1^{bc} ± 2,2
P20F3	15,4^{c} ± 0,6	49,87^{b} ± 0,3	64,9^{b} ± 0,3	80,4^{c} ± 1,4

A10F3: Fração peptídica (< 3kDa) de camarão com GH de 10% utilizando Alcalase; A20F3: Fração peptídica (< 3kDa) de camarão com GH de 20% utilizando Alcalase; P10F3: Fração peptídica (<3kDa) de camarão com GH de 10% utilizando Protamex; P20F3: Fração peptídica (<3kDa) de camarão com GH de 20% utilizando Protamex. Letras iguais na mesma coluna, indicam que não há diferença significativa entre as concentrações (p > 0,05).

Observando os resultados apresentados na Tabela 2, verificou-se que as frações peptídicas obtidas via hidrólise com a enzima Alcalase apresentaram valores de inibição superiores aos valores encontrados para as frações peptídicas obtidas via ação da enzima Protamex. Diferentes autores reportaram que a enzima Alcalase apresenta elevado potencial para produzir peptídeos com caráter anti-hipertensivo, uma vez que essa protease possui afinidade por aminoácidos hidrofóbicos (ALEMÁN et al., 2011; LI et al., 2005; TIENGO; FARIA; NETTO, 2009). De acordo com Lee e Hur (2017), os peptídeos que apresentam aminoácidos hidrofóbicos na posição C-terminal têm sido reportados como importantes agentes inibidores de ECA. De acordo com Kim e Wijesekara (2010), os aminoácidos presentes C-terminal e os aminoácidos alifáticos de cadeia ramificada no N-terminal (como triptofano,

tirosina, prolina ou fenilalanina) apresentam a capacidade de ligar-se ao sitio ativo da ECA, bloqueando a sua bioatividade.

Com relação ao grau de hidrólise, foram encontrados valores de maior inibição para as frações com menor GH, indicando que o maior comprimento de cadeia contribui para a propriedade anti-hipertensiva das frações peptídicas. Assim, observando os resultados de inibição da ECA apresentados na Tabela 2, supõe-se que a bioatividade dos peptídeos pode ser atribuída não apenas à massa molecular, composição de aminoácidos ou sequência da proteína, mas principalmente à especificidade de atuação da enzima utilizada durante a hidrólise enzimática. De acordo com Lassoued et al. (2015) a utilização de enzimas que possibilitam a liberação de aminoácidos capazes de ligar-se ao sitio ativo da enzima ECA, tende a ser um fator de elevada relevância quando se busca peptídeos com capacidade anti-hipertensiva.

4 CONCLUSÃO

Os resultados desse estudo indicam que as frações peptídicas de camarão branco apresentaram capacidade antioxidante e anti-hipertensiva. Em geral, as frações hidrolisadas com a enzima Alcalase apresentaram maior atividade antioxidante, sendo influenciada pelo grau de hidrólise e massa molecular. Além disso, as frações peptídicas hidrolisadas com Alcalase apresentaram maior efeito anti-hipertensivo, independente do grau de hidrólise utilizado.

5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALAM, M. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, n. 2, p. 143–152, 2013.

ALEMÁN, A.; PÉREZ-SANTÍN, E.; BORDENAVE-JUCHEREAU, S.; ARNAUDIN, I.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; MONTERO, P. Squid gelatin hydrolysates with antihypertensive, anticancer and antioxidant activity. **Food Research International**, v. 44, n. 4, p. 1044–1051, 2011.

ARUOMA, O. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 75, n. 2, p. 199–212, 1998.

BAHARUDDIN, N. A.; HALIM, N. R. A.; SARBON, N. M. Effect of degree of hydrolysis

(DH) on the functional properties and angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity of eel (*Monopterus sp.)* protein hydrolysate. **International Food Research Journal**, v. 23, n. 4, p. 1424–1431, 2016.

BECKER, E. M.; NISSEN, L. R.; SKIBSTED, L. H. Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. **European Food Research and Technology**, v. 219, n. 6, p. 561–571, 2004.

BKHAIRIA, I.; BEN SLAMA BEN SALEM, R.; NASRI, R.; JRIDI, M.; GHORBEL, S.; NASRI, M. In-vitro antioxidant and functional properties of protein hydrolysates from golden grey mullet prepared by commercial, microbial and visceral proteases. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 7, p. 2902–2912, 2016.

BORAWSKA, J.; DAREWICZ, M.; VEGARUD, G. E.; MINKIEWICZ, P. Antioxidant properties of carp (*Cyprinus carpio L.*) protein ex vivo and in vitro hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 194, p. 770–779, 2016.

BUTTERFIELD, D. A.; CASTEGNA, A.; POCERNICH, C. B.; DRAKE, J.; SCAPAGNINI, G.; CALABRESE, V. Nutritional approaches to combat oxidative stress in Alzheimer's disease. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, n. 8, p. 444–461, 2002.

CENTENARO, G. S.; MELLADO, M. S.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Antioxidant activity of protein hydrolysates of fish and chicken bones. **Advance Journal of Food Science and Technology**, v. 3, n. 4, p. 280–288, 2011.

CENTENARO, G. S.; SALAS-MELLADO, M.; PIRES, C.; BATISTA, I.; NUNES, M. L.; PRENTICE, C. Fractionation of protein hydrolysates of fish and chicken using membrane ultrafiltration: Investigation of antioxidant activity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 6, p. 2877–2893, 2014.

CHEN, C.; CHI, Y. J.; ZHAO, M. Y.; XU, W. Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant and ACE inhibitory activities of egg white protein hydrolysate. **Food Science and Biotechnology**, v. 21, n. 1, p. 27–34, 2012.

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.

CHI, C. F.; HU, F. Y.; WANG, B.; LI, T.; DING, G. F. Antioxidant and anticancer peptides from the protein hydrolysate of blood clam (*Tegillarca granosa*) muscle. **Journal of Functional Foods**, v. 15, p. 301–313, 2015.

CHI, C. F.; WANG, B.; DENG, Y. Y.; WANG, Y. M.; DENG, S. G.; MA, J. Y. Isolation and characterization of three antioxidant pentapeptides from protein hydrolysate of monkfish (*Lophius litulon*) muscle. **Food Research International**, v. 55, p. 222–228, 2014.

COELHO, M. S. AND SALAS-MELLADO, M. M. Alegación de Salud de Las Proteínas de Semilla de Chia: Actividad Antioxidant. **La Alimentación Latinoamericana**, v. 334, p. 64–69, 2017.

CUSHMAN, D.; CHEUNG, H. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin converting enzyme of rabbit lung. **Biochem Pharmacol**, v. 29, p. 1637,1648, 1971.

SANTOS, S. D. A.; MARTINS, V. G.; SALAS-MELLADO, M.; PRENTICE, C. Evaluation of functional properties in protein hydrolysates from Bluewing Searobin (*Prionotus punctatus*) obtained with different microbial enzymes. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, n. 8, p. 1399–1406, 2011.

EJIKE, C. E. C. C.; COLLINS, S. A.; BALASURIYA, N.; SWANSON, A. K.; MASON, B.; UDENIGWE, C. C. Prospects of microalgae proteins in producing peptide-based functional foods for promoting cardiovascular health. **Trends in Food Science and Technology**, v. 59, p. 30–36, 2017.

FARVIN, K. H. S.; ANDERSEN, L. L.; NIELSEN, H. H.; JACOBSEN, C.; JAKOBSEN, G.; JOHANSSON, I.; JESSEN, F. Antioxidant activity of Cod (*Gadus morhua*) protein hydrolysates: In vitro assays and evaluation in 5% fish oil-in-water emulsion. **Food Chemistry**, v. 149, p. 326–334, 2014.

FARVIN, K. H. S.; ANDERSEN, L. L.; OTTE, J.; NIELSEN, H. H.; JESSEN, F.; JACOBSEN, C. Antioxidant activity of cod (*Gadus morhua*) protein hydrolysates: Fractionation and characterisation of peptide fractions. **Food Chemistry**, v. 204, p. 409–419, 2016.

FONSECA, R. A. S.; SILVA, C. M.; ROSA, G. F.; PRENTICE, C. Peptides obtained from proteins of cobia (*Rachycentron canadum*): A study of potentially safe antioxidants for food. **International Food Research Journal**, v. 24, n. 6, p. 2500–2508, 2017.

GIRGIH, A. T.; UDENIGWE, C. C.; HASAN, F. M.; GILL, T. A.; ALUKO, R. E. Antioxidant properties of Salmon (*Salmo salar*) protein hydrolysate and peptide fractions isolated by reverse-phase HPLC. **Food Research International**, v. 52, n. 1, p. 315–322, 2013.

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-LEDESMA, B.; DEL MAR CONTRERAS, M.; RECIO, I. Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into foods. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 165, n. 1, p. 23–35, 2011.

JAIN, S.; ANAL, A. K. Production and characterization of functional properties of protein hydrolysates from egg shell membranes by lactic acid bacteria fermentation. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 5, p. 1062–1072, 2017.

JANG, H. L.; LICEAGA, A. M.; YOON, K. Y. Purification, characterisation and stability of an antioxidant peptide derived from sandfish (*Arctoscopus japonicus*) protein hydrolysates. **Journal of Functional Foods**, v. 20, p. 433–442, 2016.

KAMAU, S. M.; LU, R. The Effect of Enzymes and Hydrolysis Conditions on Degree of Hydrolysis and DPPH Radical Scavening Activity of Whey Protein Hydrolysates. **Current Research in Dairy Sciences**, v. 3, n. 1, p. 25–35, 2011.

KEARNEY, P. M.; WHELTON, M.; REYNOLDS, K.; MUNTNER, P.; WHELTON, P.; HE, J. Global burden of hypertension--analysis of worldwide data. **Lancet**, v. 365, p. 217–223, 2005.

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.

KO, S. C.; JANG, J.; YE, B. R.; KIM, M. S.; CHOI, I. W.; PARK, W. S.; HEO, S. J.; JUNG, W. K. Purification and molecular docking study of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from hydrolysates of marine sponge Stylotella aurantium. **Process**

Biochemistry, v. 54, p. 180–187, 2017.

LAFARGA, T.; HAYES, M. Bioactive protein hydrolysates in the functional food ingredient industry: Overcoming current challenges. **Food Reviews International**, v. 33, n. 3, p. 217–246, 2017.

LAHOGUE, V.; RÉHEL, K.; TAUPIN, L.; HARAS, D.; ALLAUME, P. A HPLC-UV method for the determination of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity. **Food Chemistry**, v. 118, n. 3, p. 870–875, 2010.

LASSOUED, I.; MORA, L.; NASRI, R.; AYDI, M.; TOLDRÁ, F.; ARISTOY, M. C.; BARKIA, A.; NASRI, M. Characterization, antioxidative and ACE inhibitory properties of hydrolysates obtained from thornback ray (*Raja clavata*) muscle. **Journal of Proteomics**, v. 128, p. 458–468, 2015.

LI, X. R.; CHI, C. F.; LI, L.; WANG, B. Purification and identification of antioxidant peptides from protein hydrolysate of scalloped hammerhead (*Sphyrna lewini*) cartilage. **Marine Drugs**, v. 15, n. 3, 2017.

LIU, Y.; LI, X.; CHEN, Z.; YU, J.; WANG, F.; WANG, J. Characterization of structural and functional properties of fish protein hydrolysates from surimi processing by-products. **Food Chemistry**, v. 151, p. 459–465, 2014.

LUO, F.; XING, R.; WANG, X.; YANG, H.; LI, P. Antioxidant activities of *Rapana venosa* meat and visceral mass during simulated gastrointestinal digestion and their membrane ultrafiltration fractions. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 53, n. 2, p. 395–403, 2018.

MOHAMED, S. Functional foods against metabolic syndrome (obesity, diabetes, hypertension and dyslipidemia) and cardiovasular disease. **Trends in Food Science and Technology**, v. 35, n. 2, p. 114–128, 2014.

NGO, D. H.; RYU, B.; KIM, S. K. Active peptides from skate (*okamejei kenojei*) skin gelatin diminish angiotensin-i converting enzyme activity and intracellular free radical-mediated oxidation. **Food Chemistry**, v. 143, p. 246–255, 2014.

NIMALARATNE, C.; BANDARA, N.; WU, J. Purification and characterization of antioxidant peptides from enzymatically hydrolyzed chicken egg white. **Food Chemistry**, v. 188, p. 467–472, 2015.

NWACHUKWU, I. D.; GIRGIH, A. T.; MALOMO, S. A.; ONUH, J. O.; ALUKO, R. E. Thermoase-derived flaxseed protein hydrolysates and membrane ultrafiltration peptide fractions have systolic blood pressure-lowering effects in spontaneously hypertensive rats. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 10, p. 18131–18147, 2014.

RAZALI, A. N.; AMIN, A. M.; SARBON, N. M. Antioxidant activity and functional properties of fractionated cobia skin gelatin hydrolysate at different molecular weight. **International Food Research Journal**, v. 22, n. 2, p. 651–660, 2015.

ROSLAN, J.; MUSTAPA KAMAL, S. M.; KHAIRUL, K. F.; ABDULLAH, N. Assessment on multilayer ultrafiltration membrane for fractionation of tilapia by-product protein hydrolysate with angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity. **Separation and Purification Technology**, v. 173, p. 250–257, 2017.

ROSLAN, J.; MUSTAPA KAMAL, S. M.; KHAIRUL, K. F.; ABDULLAH, N. Evaluation on performance of dead-end ultrafiltration membrane in fractionating tilapia by-product

protein hydrolysate. **Separation and Purification Technology**, v. 195, n. 2017, p. 21–29, 2018.

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.

SAIDI, S.; DERATANI, A.; BELLEVILLE, M. P.; BEN AMAR, R. Antioxidant properties of peptide fractions from tuna dark muscle protein by-product hydrolysate produced by membrane fractionation process. **Food Research International**, v. 65, n. PC, p. 329–336, 2014.

SALAMPESSY, J.; REDDY, N.; PHILLIPS, M.; KAILASAPATHY, K. Isolation and characterization of nutraceutically potential ACE-Inhibitory peptides from leatherjacket (*Meuchenia sp.)* protein hydrolysates. **LWT - Food Science and Technology**, v. 80, p. 430–436, 2017.

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

SHAZLY, A. B.; HE, Z.; EL-AZIZ, M. A.; ZENG, M.; ZHANG, S.; QIN, F.; CHEN, J. Fractionation and identification of novel antioxidant peptides from buffalo and bovine casein hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 232, p. 753–762, 2017.

SILVA, C. M.; FONSECA, R. A. DOS S. DA; PRENTICE, C. Comparing the Hydrolysis Degree of Industrialization By Products od Withemouth Croaker (*Micropogonias furnieri*) Using Microbial Enzymes. **International Food Research Journal**, v. 21, n. 5, p. 1757–1761, 2014.

SIMPSON, B. K.; NAYERI, G.; YAYLAYAN, V.; ASHIE, I. N. A. Enzymatic Hydrolysis of Shrimp Meat. **Food Chemistry**, v. 61, n. 1, p. 131–138, 1998.

SUWAL, S.; KETNAWA, S.; LICEAGA, A. M.; HUANG, J. Y. Electro-membrane fractionation of antioxidant peptides from protein hydrolysates of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) byproducts. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 45, n. July 2017, p. 122–131, 2018.

TAVARES, T. G.; AMORIM, M.; GOMES, D.; PINTADO, M. E.; PEREIRA, C. D.; MALCATA, F. X. Manufacture of bioactive peptide-rich concentrates from Whey: Characterization of pilot process. **Journal of Food Engineering**, v. 110, p. 547–552, 2012.

UDENIGWE, C. C.; ALUKO, R. E. Food protein-derived bioactive peptides: Production, processing, and potential health benefits. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 1, 2012.

VERMEIRSSEN, V.; VAN CAMP, J.; VERSTRAETE, W. Optimisation and validation of an angiotensin-converting enzyme inhibition assay for the screening of bioactive peptides. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 51, n. 1, p. 75–87, 2002.

VILLAMIL, O.; VÁQUIRO, H.; SOLANILLA, J. F. Fish viscera protein hydrolysates: Production, potential applications and functional and bioactive properties. **Food Chemistry**, v. 224, p. 160–171, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WORLD HEALTH STATISTICS - MONITORING HEALTH FOR THE SDGs. **World Health Organization**, p. 1.121, 2016.

WU, J. Improved method for direct high-performance liquid chromatography assay of

angiotensin-converting enzyme-catalyzed reactions. **Journal of Chromatography A**, v. 15, n. 950, p. 125–130, 2002.

WU, J.; LIAO, W.; UDENIGWE, C. C. Revisiting the mechanisms of ACE inhibitory peptides from food proteins. **Trends in Food Science and Technology**, v. 69, p. 214–219, 2017.

XIE, Z.; HUANG, J.; XU, X.; JIN, Z. Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate. **Food Chemistry**, v. 111, n. 2, p. 370–376, 2008.

YANG, Z. C.; YANG, L.; ZHANG, Y. X.; YU, H. F.; AN, W. Effect of heat and pH denaturation on the structure and conformation of recombinant human hepatic stimulator substance. **Protein Journal**, v. 26, n. 5, p. 303–313, 2007.

ZHANG, S. B.; WANG, Z.; XU, S. Y. Antioxidant and antithrombotic activities of rapeseed peptides. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 85, n. 6, p. 521–527, 2008.

ZHENG, L.; ZHAO, M.; XIAO, C.; ZHAO, Q.; SU, G. Practical problems when using ABTS assay to assess the radical-scavenging activity of peptides: Importance of controlling reaction pH and time. **Food Chemistry**, v. 192, p. 288–294, 2016.

ZHU, L.; JIE, C.; TANG, X.; XIONG, Y. L. Reducing, radical scavenging, and chelation properties of in vitro digests of alcalase-treated zein hydrolysate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 8, p. 2714–2721, 2008.

ZHU, Z.; YUAN, F.; XU, Z.; WANG, W.; DI, X.; BARBA, F. J.; SHEN, W.; KOUBAA, M. Stirring-assisted dead-end ultrafiltration for protein and polyphenol recovery from purple sweet potato juices: Filtration behavior investigation and HPLC-DAD-ESI-MS2profiling. **Separation and Purification Technology**, v. 169, p. 25–32, 2016.

ARTIGO IV

NANOENCAPSULAÇÃO POR LIPOSSOMAS DE FRAÇÕES PEPTÍDICAS DE CAMARÃO BRANCO (*Litopenaeus vannamei*)

RESUMO

Esse estudo teve como objetivo encapsular frações peptídicas de camarão branco por lipossomas e caracterizá-los mediante tamanho, índice de polidispersão, estabilidade, morfologia, eficiência de encapsulação, atividade antioxidante e anti-hipertensiva. Para tanto, hidrolisados proteicos do músculo de camarão branco com grau de hidrólise de 10 e 20%, obtidos utilizando as proteases Alcalase e Protamex, foram ultrafiltrados utilizando membrana com massa molecular de 3 kDa. As frações com massa molecular inferior a 3kDa foram encapsuladas mediante lipossomas utilizando como material de parede fosfatidilcolina purificada. O tamanho das cápsulas em suspensão variou entre 102,1 e 161 nm, enquanto que o índice de polidispersão mínimo observado foi de 0,194. Com relação a estabilidade das nanocápsulas, para o potencial zeta, não foi observado diferenças significativas ao longo do armazenamento de 7 dias à 4 ºC. As cápsulas peptídicas de camarão branco apresentaram estrutura esférica e elevada eficiência de encapsulação para os peptídeos com GH de 10%. Apenas as frações de maior eficiência tiveram sua capacidade antioxidante e anti-hipertensiva avaliada após encapsulação, e os resultados indicaram que as atividades biológicas foram afetadas pelo processo de encapsulação, com exceção da amostra hidrolisada com Protamex e grau de hidrólise de 10%, que não apresentou diferença significativa para atividade antioxidante após encapsulamento. Os resultados desse estudo indicam que é possível obter nanolipossomas estáveis contendo frações peptídicas de camarão branco.

Palavras-Chave: Bioatividade. Caracterização. Crustáceos. Lipossomas. Peptídeos.

1 INTRODUÇÃO

Os peptídeos bioativos são frações de proteína de baixa massa molecular com sequências de aminoácidos que podem promover diversas atividades biológicas (CHUN; MIN; JO, 2017). Estes são compostos tipicamente obtidos através da clivagem de ligações peptídicas via hidrólise enzimática sob condições *in vitro* ou *in vivo* (SAADI et al., 2015). Entre as atividades fisiológicas apresentadas pelos peptídeos, destacam-se a bioatividade anti-hipertensiva e antioxidante. Os peptídeos anti-hipertensivos são relatados como compostos capazes de atuar na inibição da enzima conversora de angiotensina - I (ECA) responsável pelo aumento da pressão arterial sanguínea (LEE; HUR, 2017). Entretanto, os peptídeos antioxidantes, são compostos capazes de retardar os processos oxidativos através do bloqueio do efeito danoso dos radicais livres (NIKOO; BENJAKUL, 2015). O excesso de radicais livres no organismo vem sendo associado a muitos transtornos metabólicos que originam diferentes doenças, como diabetes mellitus, câncer, doenças neurodegenerativas e cardiovasculares (CAI et al., 2015; SILA; BOUGATEF, 2016). Os peptídeos obtidos a partir de fontes aquáticas apresentam elevada atividade anti-hipertensiva e antioxidante (CENTENARO et al., 2014; MOSQUERA et al., 2014, 2016; ZAMORA-SILLERO et al., 2018; ZAVAREZE et al., 2014). Entre os animais aquáticos, o camarão branco apresenta elevado potencial para a obtenção de peptídeos devido ao seu elevado teor proteico e composição aminoacídica balanceada (MARTINI; NURSYAM; FADJAR, 2015; SIMPSON et al., 1998).

O mecanismo de atuação dos peptídeos bioativos ainda não é bem esclarecido, uma vez que são compostos altamente heterogêneos e que dependendo do substrato, tipo de enzima e grau de hidrólise empregado durante seu processo de obtenção, podem apresentar inúmeras sequências e composições aminoacídicas que conferem diferentes bioatividades (BAHARUDDIN; HALIM; SARBON, 2016; HALIM; YUSOF; SARBON, 2016; LIU et al., 2014). A massa molecular dos peptídeos anti-hipertensivos e antioxidantes exerce influência sobre tais funções fisiológicas, geralmente um menor tamanho confere uma melhor bioatividade (CHI et al., 2014; NGO et al., 2016). Além disso, alguns autores, reportam que as bioatividades desses peptídeos é também influenciada pelos resíduos de aminoácidos presentes no C-terminal e N-Terminal da sequência peptídica (SAIGA et al., 2006; ZHANG et al., 2010). Nesse sentido, a proteção dos terminais das sequências peptídicas é reportada como necessária para preservação da bioatividade dos peptídeos, uma vez que esses compostos apresentam uma reatividade química relativamente alta, o que pode afetar negativamente sua estabilidade

durante o processamento e em condições fisiológicas (MOHAN et al., 2015; SAADI et al., 2015; UDENIGWE, 2014).

A encapsulação é considerada uma técnica eficaz para aprisionar compostos bioativos dentro de um material polimérico com a finalidade de proteção e entrega controlada (WEN et al., 2017). Dentre as técnicas relatadas para encapsular peptídeos bioativos, os lipossomas estão sendo estudados como uma alternativa para encapsulação destes compostos (HOSSEINI; RAMEZANZADE; NIKKHAH, 2017). Os lipossomas são vesículas coloidais constituídas por uma ou mais bicamadas lipídicas, que envolvem uma fase aquosa denominada de núcleo, dentro de uma membrana lipídica, que podem ser utilizados para a encapsulação de compostos solúveis em água, lipossolúveis e anfifílicos (GHORBANZADE et al., 2017; MOSQUERA et al., 2016; ZAVAREZE et al., 2014).

Nesse sentido, o objetivo do presente estudo foi (1) nanoencapsular peptídeos bioativos de camarão branco de baixa massa molecular (< 3 kDa) por lipossomas; (2) caracterizar os nanolipossomas peptídicos de camarão branco e (3) avaliar a influência do encapsulamento sobre as atividades antioxidante e anti-hipertensiva dos peptídeos nanoencapsulados.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

2.1.1 Matéria-prima

A matéria prima utilizada foi o camarão branco, cultivado em sistema biofloco, pertencente à espécie *Litopenaeus vannamei,* obtido mediante doação pela Estação Marinha de Aquicultura (EMA) pertencente à Universidade Federal do Rio Grande (FURG), localizada no Bairro Querência, Balneário Cassino situado na cidade de Rio Grande - RS. A espécie foi obtida a partir de tanques de cultivo e foi transportada em caixas térmicas contendo gelo até o Laboratório de Processamento de Pescado da Universidade Federal de Rio Grande, onde foi beneficiada e armazenada em sacos de polietileno sob congelamento à -18 ºC.

2.1.2 Enzimas e reagentes

As enzimas utilizadas no processo de hidrólise foram: Alcalase 2.4 L (endopeptidase bacteriana produzida pelo *Bacillus licheniformis*) e Protamex (mistura de exo e endopeptidases bacterianas, produzida a partir do *Bacillus subitilis*) obtidas através de doação pela Novozymes Latina Americana Ltda e adquirida da Sigma Aldrich, respectivamente. A Lecitina de Soja foi adquirida da Importadora Química Delaware (Porto Alegre – RS). ABTS (2,2´-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico), HHL (hipuril-histidil-leucina) e a enzima conversora da angiotensina - I (ECA) foram adquiridos da Sigma Aldrich. Os demais reagentes utilizados, foram de grau analítico (P.A.).

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Obtenção dos hidrolisados proteicos de camarão branco

Os hidrolisados proteicos de camarão branco foram obtidos a partir da fração proteica presente no músculo da espécime. Para realização do processo de hidrólise enzimática, o camarão branco foi processado e sanitizado. Em seguida, o músculo utilizado como fonte proteica foi triturado e homogeneizado com água destilada na proporção 1:2 (p:v). Após homogeneização, foi realizada a inativação das enzimas endógenas presentes no músculo do crustáceo em banho termostatizado a 90 °C durante 20 min, a reação de hidrólise foi realizada em reator de vidro encamisado conectado a um banho termostatizado. O pH e a temperatura da reação foram mantidos constantes, de acordo com as condições ótimas das enzimas (Alcalase (pH 8, 50 ºC) e Protamex (pH 7, 50 ºC)). A proporção de enzima utilizada foi de 1% em relação a massa de músculo. O grau de hidrólise (GH) foi monitorado pelo método de pH-stat até que a reação atingisse GH de 10 e 20 %, através da utilização de NaOH (1M) para manter o pH ótimo de atuação de cada enzima (ADLER-NISSEN, 1986). Então, as enzimas foram inativadas por aquecimento (90 °C/20 min) em banho termostatizado, seguida de arrefecimento à temperatura ambiente. Posteriormente, um processo de centrifugação a 14000 *x* g durante 20 min a 4 ºC foi empregado para separação das frações solúveis e insolúveis. Por fim, o sobrenadante (fração solúvel) foi congelado em ultrafreezer a -80 ºC, liofilizado em liofilizador (-55 °C/50 μHg) (Liotop L108, São Carlos, Brasil), e armazenado à -18 ºC para análises posteriores (ALEMÁN et al., 2011; LIU et al., 2014; NGO; RYU; KIM, 2014).

2.2.2 Obtenção das frações peptídicas de camarão branco

As frações peptídicas de camarão branco foram obtidas mediante sistema de ultrafiltração com agitação magnética e capacidade de 300 mL de acordo com Centenaro et al. (2014) utilizando membranas de ultrafiltração de celulose regenerada com 76 mm de diâmetro e massa molecular de corte de 3 kDa. As frações peptídicas de menor massa molecular (< 3kDa) foram congeladas (-80 ºC) e liofilizadas (-55 °C/50 μHg) (Liotop L108, São Carlos, Brasil) e, armazenadas à -18 ºC para posteriores análises. As frações foram codificadas como F3.

2.2.3 Purificação da lecitina de soja bruta

Para obtenção da fosfatidilcolina, material de parede dos lipossomas, a lecitina de soja bruta, foi purificada segundo método descrito por Mosquera et al. (2014). Uma massa de 100 g de lecitina de soja bruta foi dissolvida em 500 mL de acetato de etila. Em seguida, adicionou-se lentamente 20 mL de água destilada e manteve-se a solução sob agitação manual, resultando na formação de duas fases. A fase superior foi separada da fase inferior e foi descartada. Enquanto que a fase inferior, foi dispersa em 300 mL de acetona, formando "grumos" que foram moídos com o auxílio de um bastão de vidro. Em seguida, a acetona foi separada por decantação e adicionou-se uma nova alíquota de 300 mL de acetona, repetindo-se o processo de dispersão dos grumos. Novamente, a acetona adicionada foi separada por decantação, sendo esse processo foi repetido por 5 vezes. O precipitado foi filtrado à vácuo e seco em um dessecador durante 24 h. Por fim, o produto obtido denominado fosfatidilcolina purificada foi macerado e armazenado à - 18 ºC.

2.2.4 Encapsulação por Lipossomas

O processo de encapsulação por lipossomas das frações peptídicas de camarão foi realizado pela metodologia de hidratação do filme, segundo método descrito por Zavareze et al. (2014) com adaptações. Uma massa de 1 g de fosfatidilcolina purificada foi dissolvida em 10 mL de clorofórmio em um balão de vidro com fundo redondo (250 mL) até sua completa dispersão. Em seguida, o solvente foi evaporado usando um evaporador rotativo até formar um filme lipídico nas paredes do balão. Os traços do clorofórmio foram evaporados pelo armazenamento do balão durante 18 h em dessecador à vácuo em temperatura ambiente. O filme lipídico resultante foi diluído em 20 mL de tampão fosfato pH 7,0 (0,2 M) contendo 0,2

g de fração peptídica. A mistura contida no balão foi submetida ao aquecimento a 60 ºC durante 3 min e agitação lenta. Logo após, a mistura foi submetida a 10 ciclos de agitação em vórtex (1 min), repouso (3 min) e aquecimento a 60 ºC (2 min). E por fim, a suspensão de lipossomas contendo as frações peptídicas foi submetida a 5 ciclos de sonificação em um desruptor celular ultrassônico, durante 1 min e repouso em água fria durante 3 min.

2.2.5 Caracterização dos lipossomas

As cápsulas peptídicas foram caracterizadas em termos de tamanho das partículas, índice de polidispersão, estabilidade (potencial zeta), análise morfológica (microscopia eletrônica de varredura – MEV).

2.2.5.1 Tamanho de partícula e polidispersão

O tamanho médio das cápsulas peptídicas e o índice de polidispersão (PDI) foram avaliados pela técnica de espalhamento dinâmico da luz utilizando Zetasizer (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, UK) equipado com laser Heene em comprimento de onda de 633 nm (TEIXEIRA et al., 2008). Todas as análises foram realizadas em triplicata a 25 ºC, cada medição de tamanho e PDI foram realizadas com um ângulo de detecção de 173º. Para análise, foram utilizadas duas gotas de lipossomas dissolvidas em 8 mL de tampão fosfato (pH 7,0; 0,2 M).

2.2.5.2 Estabilidade dos lipossomas

Os lipossomas foram avaliados com relação a sua estabilidade para o potencial zeta, nos tempos 1 e 7 dias sob armazenamento a 4 ºC em frasco âmbar. Para análise, os lipossomas foram diluídos em água destilada na proporção 1:3 (v:v), utilizando o equipamento Zetasizer (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, UK) à 25 ºC.

2.2.5.3 Microscopia eletrônica de varredura

A morfologia da superfície foi avaliada utilizando um microscópio eletrônico de varredura (Jeol, JSM - 6610LV, Tóquio, Japão). As amostras foram depositadas diretamente em *stubs* de alumínio usando uma fita adesiva de carbono de dupla face e foram revestidas com

uma fina camada de ouro. Um potencial de aceleração de 15 kV foi utilizado durante a micrografia.

2.2.6 Eficiência de encapsulação (EE)

A eficiência de encapsulação das frações peptídicas foi realizada de acordo com Mohan, Mcclements e Udenigwe, (2016) e Li, Paulson e Gill (2015) com adaptações. A EE representada em percentagem, foi definida como a proporção de peptídeos encapsulados para peptídeos totais, sendo calculada de acordo com a Equação 1.

$$EE\ (\%) = \frac{PE}{PT} \times 100 \quad (1)$$

Onde PE são os peptídeos encapsulados e PT são os peptídeos totais.

Para a determinação de PE foi necessário determinar de forma indireta o conteúdo de peptídeos não encapsulados, através da Equação 2.

$$PE = PT - PNE \quad (2)$$

Onde PE são os peptídeos encapsulados, PT são os peptídeos totais e PNE são os peptídeos não encapsulados.

Sendo o valor de PNE determinado a partir de um processo de separação por membranas de ultrafiltração com massa de corte de 3 kDa sob pressão de 60 psi para separar os PE dentro dos lipossomas dos PNE presentes na fase aquosa. PNE foi determinado a partir da do conteúdo do filtrado obtido pela célula de ultrafiltração na proporção de 1:2 (v:v) com água ultrapura, e foi medido usando kit Pierce™ BCA Protein Assay (Richmond, CA, EUA) através da leitora de microplacas a 515 nm. Os lipossomas vazios também foram filtrados e considerados como valor de branco. As concentrações de peptídeos foram obtidas a partir de curva padrão preparada com o peptídeos liofilizado.

2.2.7 Avaliação da bioatividade dos lipossomas

2.2.7.1 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante apresentada pelas frações peptídicas, antes e após o encapsulamento, foi avaliada pelo método de captura do radical ABTS descrito por Re et al. (1999). Para avaliação da atividade antioxidante, uma solução estoque do radical ABTS contendo 7 mM de ABTS em 2,45 mM de persulfato de potássio foi mantida em escuro à temperatura ambiente durante 16 h. Posteriormente, uma alíquota de solução estoque foi diluída em álcool etílico até uma absorbância de 0,70 ± 0,02 a 734 nm, obtendo assim a solução de trabalho do radical ABTS. Em seguida, uma alíquota de 20 uL de lipossomas (5 $mg.mL^{-1}$) e 980 uL de ABTS (0,1 $mmol.L^{-1}$ em 95% etanol) foi homogeneizada em *vórtex* durante 5 s e, mantida no escuro à temperatura ambiente durante 10 min. A absorbância da solução foi medida a 734 nm em espectrofotômetro. A capacidade de captura do radical livre ABTS apresentada pelas amostras foi expressa em percentual (%), conforme apresentado pela Equação 3.

$$ABTS^{+}(\%) = \left[\frac{(A_{controle} - A_{amostra})}{A_{controle}}\right] \times 100\ \% \qquad (3)$$

Onde $A_{controle}$ é a absorbância sem lipossoma e $A_{amostra}$ é a absorbância com lipossoma.

2.2.7.2 Avaliação da Atividade Anti-hipertensiva

A atividade inibitória de ECA apresentada pelas frações peptídicas antes e após o encapsulamento por lipossomas, foi avaliada segundo metodologia descrita por Cushman e Cheung, (1971), Lahogue et al. (2010) e Wu, (2002). Um volume total de reação de 230 µL, constituído por 50 µL de HHL (5 mM) e 160 µL de ECA (0,025 $U.mL^{-1}$) e 20 µL de amostra na concentração de 2 $mg.mL^{-1}$ (todas diluídas em tampão borato de sódio (0,1M) pH 8,3 contendo 0,3 M de cloreto de sódio (NaCl)), foi incubado a 37 °C em banho termostatizado durante 30 minutos. Em seguida, foi adicionado 100 uL de ácido clorídrico para interromper a reação. Logo após, a mistura foi centrifugada a 1000 *x* g por 10 minutos. O AH liberado foi quantificado por através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), utilizando uma coluna C18 (Zorbax, Eclipse XDB) (4,6 x 150 mm; 5 µm). O volume de injeção foi de 50 µL,

com taxa de fluxo de 0,7 $mL.min^{-1}$ utilizando um gradiente com duas misturas de solventes A (0,05% de ácido trifluoroacético em água) e B (0,05% ácido trifluoroacético em acetonitrila grau HPLC). A capacidade das amostras em inibirem a ECA próximo a 100%, indica que ocorreu total inibição.

2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O tratamento dos dados foi realizado utilizando software *Statístic* 5.0, nos módulos de análise de variância (ANOVA), teste de comparação de médias de Tukey e teste de *t-Student* ao nível de 5% de significância ($p<0,05$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 TAMANHO DE PARTÍCULA E ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO

A técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS) foi utilizada para determinar o tamanho médio das partículas e o índice de polidispersão dos lipossomas. De acordo com Chay, Tan e Saari (2015), a medida do tamanho das partículas tem como fundamento o princípio de DLS, que determina que as partículas se movem aleatoriamente sob o movimento browniano, e quando uma fonte de luz atinge as partículas em movimento ocorre espalhamento da luz em todas direções. Devido a esse movimento das moléculas ocorre uma flutuação na dispersão da luz, sendo a sua intensidade correlacionada com tamanho da partícula.

A Tabela 1 apresenta os resultados obtidos de tamanho médio de partícula e índice de polidispersão das nanocápsulas controle (sem peptídeo) e nanocápsulas contendo peptídeos de camarão branco submetidos a hidrólise com as enzimas Alcalase e Protamex para os graus de hidrólise 10 e 20%.

O tamanho das partículas influenciou diretamente na estabilidade, a liberação de compostos ativos e a eficiência de encapsulação (RAFIEE et al., 2017). Analisando a Tabela 1, o tamanho de partícula das cápsulas contendo peptídeos de camarão variaram na ordem de 115,6 a 161,5 nm, sendo os lipossomas produzidos com peptídeos de menor grau de hidrólise os mais estáveis, uma vez que apresentaram menor tamanho. Mosquera et al. (2014) encapsularam frações peptídicas de colágeno proveniente de pescado, com massa molecular inferior a 3 kDa em nanolipossomas de fosfatidilcolina e verificaram que o tamanho dos

lipossomas variaram entre 66,2 e 214 nm. Da mesma forma, Mohan, Mcclements e Udenigwe (2016) encapsularam diferentes frações peptídicas de soro de leite em lipossomas, e obtiveram cápsulas com tamanho de partícula entre 127 e 178 nm. Esses resultados indicam, que os tamanhos de partícula encontrados no trabalho, estão dentro do intervalo reportado pela literatura, quando encapsularam frações peptídicas de origem animal por lipossomas.

Tabela 1 – Tamanho de partícula (nm) e o índice de polidispersão das nanocápsulas controle (sem peptídeo) e nanocápsulas contendo peptídeos de camarão branco em suspensão aquosa

Amostra	Tamanho (nm)	Índice de Polidispersão
Controle	$102,1 \pm 4,5^{d}$	$0,227 \pm 0,01^{bc}$
A10F3	$115,6 \pm 0,7^{c}$	$0,194 \pm 0,01^{d}$
A20F3	$161,5 \pm 1,2^{a}$	$0,330 \pm 0,01^{a}$
P10F3	$146,4 \pm 2,6^{b}$	$0,245 \pm 0,01^{b}$
P20F3	$157,0 \pm 4,5^{a}$	$0,210 \pm 0,01^{cd}$

A10F3: Fração peptídica (< 3kDa) de camarão com GH de 10% utilizando Alcalase; A20F3: Fração peptídica (< 3kDa) de camarão com GH de 20% utilizando Alcalase; P10F3: Fração peptídica (<3kDa) de camarão com GH de 10% utilizando Protamex; P20F3: Fração peptídica (<3kDa) de camarão com GH de 20% utilizando Protamex. Os resultados são expressos como média ± desvio padrão. Letras iguais na mesma coluna, indicam que não há diferença significativa ($p > 0,05$).

Os lipossomas podem ser classificados em diferentes categorias com base no seu tamanho de partícula e número de camadas lipídicas. Os tamanhos superiores a 100 nm encontrados para os lipossomas de peptídeos de camarão podem ser classificados como vesículas de uma camada lipídica denominadas de oligomelares (FATHI; MOZAFARI; MOHEBBI, 2012; JESORKA; ORWAR, 2008). Em relação à escala nanométrica, a literatura reporta que um lipossoma pode ser considerado nano com tamanho inferior a 300 nm (ZOGHI; KHOSRAVI-DARANI; OMRI, 2016). Sendo assim, todas as cápsulas (Tabela 1) podem ser denominadas de nanolipossomas de peptídeos de camarão branco.

O índice de polidispersão (PDI) é definido como um indicador da amplitude da distribuição do tamanho de partícula variando de 0 a 1 (GIBIS; ZEEB; WEISS, 2014). Segundo Zavareze et al. (2014), um baixo valor de polidispersão representa homogeneidade na distribuição de tamanho das partículas. Observando os resultados encontrados para PDI apresentados na Tabela 1, verificou-se que todas as formulações apresentaram índices baixos de polidispersão, indicando que formaram dispersões coloidais uniformes.

Os lipossomas contendo peptídeos de camarão branco apresentaram valores de PDI inferiores aos lipossomas produzidos por Mohan et al. (2018). Esses autores, estudaram a influência da carga líquida de peptídeos de soro de leite sobre as propriedades dos lipossomas, e encontraram valores de PDI na ordem de 0,367 e 0,464. Esses resultados indicam, que os lipossomas produzidos com peptídeos de camarão branco, apresentaram suspensões mais homogêneas quando comparados aos lipossomas produzidos com peptídeos de soro de leite.

3.2 ESTABILIDADE DOS LIPOSSOMAS

O potencial zeta indica a estabilidade dos lipossomas através das cargas presentes na superfície das partículas (MOHAN et al., 2015). Chay, Tan e Saari (2015) sugeriram que o potencial zeta é um parâmetro que fornece informações sobre o potencial eletrostático das partículas em uma solução que permite avaliar a estabilidade a longo prazo de um sistema coloidal, onde valores positivos e negativos (mais de ± 30 mV) indicam repulsão suficiente para prevenir agregação e garantindo estabilidade da emulsão. A Tabela 2 apresenta o potencial zeta (mV) das nanocápsulas controle (sem peptídeo) e nanocápsulas contendo peptídeos de camarão branco submetidos a hidrólise com as enzimas Alcalase e Protamex para os graus de hidrólise 10 e 20% nos tempos de armazenamento de 1 e 7 dias a 4 ºC.

Observando os resultados apresentados na Tabela 2, verificou-se que de uma forma geral todos as nanocápsulas produzidas apresentaram valores próximos aos reportados pela literatura de ± 30 mV, o que garante a formação de uma dispersão aquosa estável (MOHAN; MCCLEMENTS; UDENIGWE, 2016). Entre os nanocáspulas contendo peptídeos, a amostra contendo P10F3 foi a mais estável no tempo de armazenamento de 1 dia, indicando que essa amostra tem uma tendência menor de precipitar e consequentemente possibilita uma maior integridade da suspensão, quando comparada com os demais lipossomas.

Em relação à estabilidade dos lipossomas ao longo do armazenamento à 4 ºC, todas as amostras não apresentaram variações significativas entre os tempos avaliados. Comportamento oposto foi relatado por Mosquera et al. (2016) que observaram reduções significativas na estabilidade de lipossomas contendo peptídeos de lula (Dosidicus gigas) com massa molecular <1 kDa. Esses autores reportaram alterações na estabilidade durante o tempo de armazenamento de 7 dias, para lipossomas nas concentrações mínimas e máximas de 0,5 mg.mL-1 e 3 mg.mL-1. Esses resultados sugerem que os lipossomas de peptídeos de camarão surgem como suspensões estáveis para armazenamento, quando comparados com a literatura reportada.

Tabela 2 – Potencial zeta das nanocápsulas controle (sem peptídeo) e nanocápsulas contendo peptídeos de camarão branco nos tempos de armazenamento de 1 e 7 dias a 4 ºC

Amostra	Potencial zeta (mV)	
	Tempo de Armazenamento (Dias)	
	1	7
Controle	-23,25 ± 0,05^{aA}	-23,70 ± 0,60^{aA}
A10F3	-25,80 ± 0,45^{bA}	-25,00 ± 1,49^{abA}
A20F3	-25,70 ± 0,51^{bA}	-25,93 ± 1,20^{abA}
P10F3	-26,70 ± 1,15^{cA}	-26,76 ± 0,25^{bA}
P20F3	-24,30 ± 0,55^{aA}	-24,80 ± 0,45^{abA}

A10F3: Fração peptídica (< 3kDa) de camarão com GH de 10% utilizando Alcalase; A20F3: Fração peptídica (< 3kDa) de camarão com GH de 20% utilizando Alcalase; P10F3: Fração peptídica (<3kDa) de camarão com GH de 10% utilizando Protamex; P20F3: Fração peptídica (<3kDa) de camarão com GH de 20% utilizando Protamex. Os resultados são expressos como média ± desvio padrão. Letras minúsculas iguais na mesma coluna, indicam que não há diferença significativa (p> 0,05) entre as amostras. Letras maiúsculas iguais na mesma linha, indicam que não há diferença significativa (p> 0,05) entre os tempos de armazenamento para mesma amostra.

3.3 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO (EE)

A Tabela 3 apresenta a eficiência de encapsulação das nanocápsulas contendo peptídeos bioativos de camarão branco.

A eficiência de encapsulação (EE) é definida pela quantidade de composto ativo (peptídeo) presente no núcleo ou na superfície do veículo em comparação com a massa inicial de peptídeo, sendo desejável obter elevadas taxas de EE, uma vez que possibilita um aumento na quantidade de composto bioativos encapsulado, reduz custos, embora a sobrecarga possa causar vazamento dos compostos bioativos (MOHAN et al., 2015).

Tabela 3 – Eficiência de encapsulação das nanocápsulas contendo peptídeos de camarão branco

Amostra	EE (%)
A10F3	69,08 ± 0,9^{b}
A20F3	58,12 ± 1,85^{d}
P10F3	72,26 ± 0,44^{a}
P20F3	65,97 ± 0,34^{c}

A10F3: Fração peptídica (< 3kDa) de camarão com GH de 10% utilizando Alcalase; A20F3: Fração peptídica (< 3kDa) de camarão com GH de 20% utilizando Alcalase; P10F3: Fração peptídica (<3kDa) de camarão com GH de 10% utilizando Protamex; P20F3: Fração peptídica (<3kDa) de camarão com GH de 20% utilizando Protamex. Os resultados são expressos como média ± desvio padrão. Letras iguais na mesma coluna, indicam que não há diferença significativa (p> 0,05)

A EE depende da composição do material encapsulado, método de encapsulação, propriedades químicas e concentração do encapsulado (TAN et al., 2014; XIA et al., 2016). Observando os resultados apresentados na Tabela 3, verificou-se que a EE variou de acordo com o peptídeo encapsulado, sendo os maiores valores observados de eficiência para as nanocápsulas contendo as frações peptídicas P10 e A10. Geralmente é reportado que quanto maior a concentração de material encapsulado menor será a EE (HOSSEINI; RAMEZANZADE; NIKKHAH, 2017). Mosquera et al. (2016) encapsularam frações contendo peptídeos de lula (*Dosidicus gigas*) e perceberam uma redução na EE quando os lipossomas na concentração de 2 $mg.mL^{-1}$ tinham sua concentração aumentada para com 3 $mg.mL^{-1}$. Entretanto, nossos resultados são superiores aos reportados por Hosseini, Ramezanzade e Nikkhah (2017) que encapsularam frações peptídicas bioativas de hidrolisados de gelatina de pescado, encontrando uma EE de 28% para mesma concentração estudada no presente trabalho de 10 $mg.mL^{-1}$.

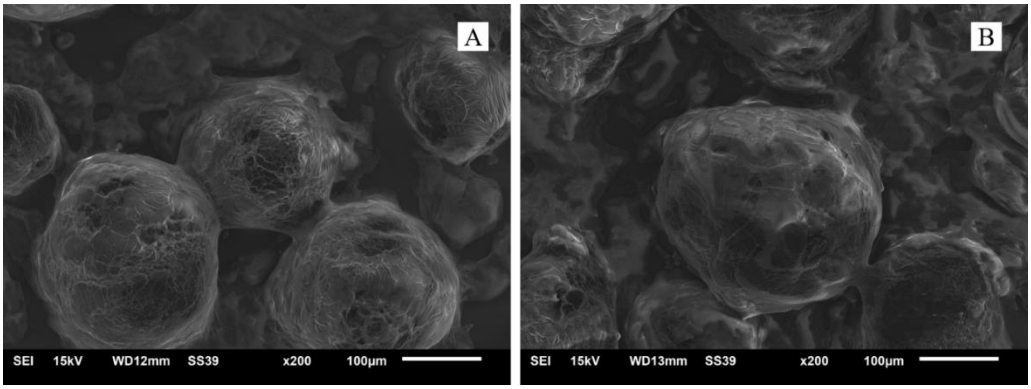
A carga líquida dos peptídeos também influencia na quantidade de material encapsulado. Maiores valores de EE são reportados para peptídeos que possuem um carga líquida positiva que facilita a interação com os fosfolipídeos de caráter aniônico presente nos lipossomas, e consequentemente aumenta a quantidade de material encapsulado (LIU et al., 2015; MORAIS et al., 2004). Nesse sentido, podemos sugerir que os lipossomas contendo as frações peptídicas P10 possuem maior caráter catiônico quando comparada com as demais amostras.

O encapsulamento de peptídeos de camarão branco por lipossomas resultou em menor EE quando comparado aos resultados encontrados por Zavareze et al. (2014) de 79,3 e 80,4% para proteína hidrolisada de corvina, mesmo sob condições de processo similares, diferindo na matéria-prima e GH obtido de aproximadamente 28%. Essa redução na EE pode ser atribuída a composição e massa molecular do material encapsulado que influenciou na interação com o lipossoma (MOHAN; MCCLEMENTS; UDENIGWE, 2016).

3.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A morfologia da superfície das nanocápsulas contendo peptídeos de camarão branco através da microscopia eletrônica de varredura indicaram que os lipossomas apresentavam morfologia esférica e característico de vesículas unilamelares concordando com os estudos realizados por Okamoto et al. (2018) e Ramezanzade, Hosseini e Nikkhah (2017). A Figura 1 apresenta as micrografias das cápsulas contendo as frações peptídicas de camarão branco A10 F3 e P10 F3.

Figura 1 - Microscopia eletrônica varredura das nanocápsulas (A) L-A10F3 (B) L-P10F3



L - A10F3: Fração peptídica (< 3kDa) de camarão com GH de 10% utilizando Alcalase encapsulada por lipossoma;
L - P10F3: Fração peptídica (<3kDa) de camarão com GH de 10% utilizando Protamex encapsulada por lipossoma.

3.5 BIOATIVIDADES

O processo de encapsulação de compostos bioativos busca preservar e garantir uma maior estabilidade ao peptídeo, protegendo a bioatividade apresentada. Em face disso, buscou-se avaliar a atividade antioxidante e anti-hipertensiva das frações peptídicas antes e após processo de encapsulação em lipossomas. Para avaliação do efeito do encapsulamento sobre as bioatividades, foram escolhidas as nanocápsulas que apresentaram maior eficiência de encapsulação (Tabela 3).

3.5.1 Avaliação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante das frações peptídicas livres e encapsuladas em lipossomas foram avaliadas mediante o ensaio de captura do radical ABTS, conforme apresenta a Tabela 4. Este ensaio foi realizado através de uma metodologia amplamente utilizada, para avaliar a capacidade do agente antioxidante, através da doação de um átomo de hidrogênio (NALINANON et al., 2011).

Como pode ser visualizado na Tabela 4, a fração peptídica P10F3 não apresentou diferença significativa na sua atividade antioxidante após o processo de encapsulação. Esse resultado sugere que o peptídeo encapsulado utilizando material lipídico não sofreu perdas na sua atividade biológica. Entretanto, a fração peptídica A10F3 apresentou uma redução significativa na sua capacidade de captura do radical ABTS.

Tabela 4 – Captura do radical livre ABTS (%) apresentada pelas frações peptídicas de camarão branco, com diferentes enzimas antes da encapsulação e após processo de encapsulação por lipossomas

Amostra	Antes Encapsulação	Após encapsulação
A10F3	64,5 ± 1,1[a]	51,22 ± 1,2[b]
P10F3	60,8 ± 0,3[a]	59,45 ± 0,7[a]

A10F3: Fração peptídica (< 3kDa) de camarão com GH de 10% utilizando Alcalase; P10F3: Fração peptídica (<3kDa) de camarão com GH de 10% utilizando Protamex. Os resultados são expressos como média ± desvio padrão. Letras iguais na mesma linha, indicam que não há diferença significativa (p> 0,05).

Diferentes autores reportam que a encapsulação de peptídeos por lipossomas garante a manutenção da atividade antioxidante após o processo de encapsulamento (HOSSEINI; RAMEZANZADE; NIKKHAH, 2017; RAMEZANZADE; HOSSEINI; NIKKHAH, 2017). No entanto, antes de avaliar a bioatividade os autores submetem o lipossoma a um aquecimento a 100 ºC durante 5 min para liberação da fração peptídica encapsulada. A etapa de liberação da fração encapsulada não foi realizada nesse estudo, sugerindo-se portanto que, se tivesse sido empregada, poderia ter facilitado a captura do radical ABTS pela fração A10F3 ou até mesmo aumentado a atividade antioxidante apresentada pela fração P10F3, conforme ocorrido no trabalho de Mosquera et al. (2014), os quais relataram uma maior capacidade antioxidante (aproximadamente 2 vezes) para a fração peptídica de pescado quando encapsulado em nanolipossomas de fosfatidilcolina.

Outras hipóteses para redução da atividade biológica da fração A10F3 são devido a degradação parcial de alguns peptídeos durante a preparação de lipossomas ou a menor disponibilidade da fração peptídica como doadora de hidrogênio devido as interações com a membrana bicamada (AZAMBUJA et al., 2015).

3.5.2 Avaliação da atividade anti-hipertensiva

A capacidade anti-hipertensiva de um composto pode ser determinada através da atividade inibitória da enzima conversora da angiotensina - I (ECA) (LEE; HUR, 2017). Diferentes peptídeos são reportados como agentes anti-hipertensivos, sendo que o peso molecular e a sequência aminoacídica são fatores determinantes que influenciam na capacidade do peptídeo em ligar-se no sítio ativo da enzima ECA causando sua inibição (HERNANDEZ-LEDESMA; CHIA-CHIEN, 2013). A capacidade anti-hipertensiva das frações peptídicas livres e encapsuladas em lipossomas são apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5 – Atividade inibitória da enzima conversora da angiotensina (ECA) apresentada pelas frações peptídicas de camarão branco, antes da encapsulação e após processo de encapsulação em lipossomas

Amostra	Antes Encapsulação	Após encapsulação
A10F3	$86,9 \pm 1,8^{a}$	$76,37 \pm 0,57^{b}$
P10F3	$81,1 \pm 2,2^{a}$	$76,53 \pm 0,36^{a}$

A10F3: Fração peptídica (< 3kDa) de camarão com GH de 10% utilizando Alcalase; P10F3: Fração peptídica (<3kDa) de camarão com GH de 10% utilizando Protamex. Os resultados são expressos como média ± desvio padrão. Letras iguais na mesma linha, indicam que não há diferença significativa (p> 0,05).

Observando os resultados apresentados na Tabela 5, verificou-se que assim como na atividade antioxidante, apenas a fração P10F3 não teve sua atividade anti-hipertensiva reduzida após o processo de encapsulação. Esse resultado corrobora com o trabalho de Mosquera et al. (2016) que verificaram que o processo de encapsulação em lipossomas não afetou a atividade anti-hipertensiva das frações peptídicas provenientes de animais aquáticos, indicando que esse método de encapsulação é adequado para preservação da bioatividade testada. No entanto, reduções na atividade anti-hipertensiva apresentada pela fração A10F3 após encapsulação foram observadas e, podem ser atribuídas a dificuldade dessa fração em ligar-se ao sitio ativo da enzima ECA devido a sua forte interação com a membrana fosfolipídica (AZAMBUJA et al., 2015). As diferenças na atividade anti-hipertensiva de peptídeos encapsulados por outros métodos de encapsulação, como *spray dryer* foram relatadas (AMIGHI; EMAM-DJOMEH; MADADLOU, 2013, 2016; ESPEJO-CARPIO; GUADIX; GUADIX, 2014). Essas reduções são atribuídas a formação de novos agregados durante a encapsulação que dificultam o peptídeo de ligar-se ao sítio ativo da enzima ECA.

4 CONCLUSÃO

Os resultados indicam que foi possível encapsular frações peptídicas com baixa massa molecular em lipossomas, e que o processo de encapsulamento resultou em nanocápsulas peptídicas com baixo índice de polidispersão, morfologia esférica e considerável estabilidade ao longo do armazenamento de 7 dias. O processo de encapsulamento atingiu maiores valores de eficiência para as frações peptídicas de menor grau de hidrólise, independente da enzima utilizada. As frações peptídicas hidrolisadas com a enzima Protamex não apresentaram reduções na sua capacidade antioxidante e anti-hipertensiva após o encapsulamento

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALEMÁN, A.; PÉREZ-SANTÍN, E.; BORDENAVE-JUCHEREAU, S.; ARNAUDIN, I.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; MONTERO, P. Squid gelatin hydrolysates with antihypertensive, anticancer and antioxidant activity. **Food Research International**, v. 44, n. 4, p. 1044–1051, 2011.

AMIGHI, F.; EMAM-DJOMEH, Z.; MADADLOU, A. Spray drying of ACE-inhibitory enzyme-modified white cheese. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 48, n. 11, p. 2276–2282, 2013.

AMIGHI, F.; EMAM-DJOMEH, Z.; MADADLOU, A. Optimised production and spray drying of ACE-inhibitory enzyme-modified cheese. **Journal of Dairy Research**, v. 83, n. 1, p. 125–134, 2016.

AZAMBUJA, C. R. L.; DOS SANTOS, L. G.; RODRIGUES, M. R.; RODRIGUES, R. F. M.; DA SILVEIRA, E. F.; AZAMBUJA, J. H.; FLORES, A. F. C.; HORN, A. P.; DORA, C. L.; MUCCILLO-BAISCH, A. L.; BRAGANHOL, E.; DA SILVA PINTO, L.; PARIZE, A. L.; DE LIMA, V. R. Physico-chemical characterization of asolectin-genistein liposomal system: An approach to analyze its in vitro antioxidant potential and effect in glioma cells viability. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 193, p. 24–35, 2015.

BAHARUDDIN, N. A.; HALIM, N. R. A.; SARBON, N. M. Effect of degree of hydrolysis (DH) on the functional properties and angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity of eel (*Monopterus sp.)* protein hydrolysate. **International Food Research Journal**, v. 23, n. 4, p. 1424–1431, 2016.

CAI, L.; WU, X.; ZHANG, Y.; LI, X.; MA, S.; LI, J. Purification and characterization of three antioxidant peptides from protein hydrolysate of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin. **Journal of Functional Foods**, v. 16, p. 234–242, 2015.

CENTENARO, G. S.; SALAS-MELLADO, M.; PIRES, C.; BATISTA, I.; NUNES, M. L.; PRENTICE, C. Fractionation of protein hydrolysates of fish and chicken using membrane ultrafiltration: Investigation of antioxidant activity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 6, p. 2877–2893, 2014.

CHAY, S. Y.; TAN, W. K.; SAARI, N. Preparation and characterisation of nanoliposomes containing winged bean seeds bioactive peptides. **Journal of Microencapsulation**, v. 32, n. 5, p. 488–495, 2015.

CHI, C.; CAO, Z.; HU, F.; LI, Z.; ZHANG, B. Antioxidant and functional properties of collagen hydrolysates from Spanish mackerel skin as influenced by average molecular weight. **Molecules**, v. 19, n. 8, p. 11211–11230, 2014.

CHUN, J. Y.; MIN, S. G.; JO, Y. J. Production of low molecular collagen peptides-loaded liposomes using different charged lipids. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 209, p. 1–8, 2017.

CUSHMAN, D.; CHEUNG, H. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin converting enzyme of rabbit lung. **Biochem Pharmacol**, v. 29, p. 1637,1648, 1971.

ESPEJO-CARPIO, F. J.; GUADIX, A.; GUADIX, E. M. Spray Drying of Goat Milk Protein Hydrolysates with Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Activity. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, n. 8, p. 2388–2396, 2014.

FATHI, M.; MOZAFARI, M. R.; MOHEBBI, M. Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. **Trends in Food Science and Technology**, v. 23, n. 1, p. 13–27, 2012.

GHORBANZADE, T.; JAFARI, S. M.; AKHAVAN, S.; HADAVI, R. Nano-encapsulation of fish oil in nano-liposomes and its application in fortification of yogurt. **Food Chemistry**, v. 216, p. 146–152, 2017.

GIBIS, M.; ZEEB, B.; WEISS, J. Formation, characterization, and stability of encapsulated hibiscus extract in multilayered liposomes. **Food Hydrocolloids**, v. 38, p. 28–39, 2014.

HALIM, N. R. A.; YUSOF, H. M.; SARBON, N. M. Functional and bioactive properties of fish protein hydolysates and peptides: A comprehensive review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 51, p. 24–33, 2016.

HERNANDEZ-LEDESMA, B.; CHIA-CHIEN, H. **Bioactive Food Peptides in Health and Disease**. Jarneza: INTECH, 2013.

HOSSEINI, S. F.; RAMEZANZADE, L.; NIKKHAH, M. Nano-liposomal entrapment of bioactive peptidic fraction from fish gelatin hydrolysate. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 105, p. 1455–1463, 2017.

JESORKA, A.; ORWAR, O. Liposomes: Technologies and Analytical Applications. **Annual Review of Analytical Chemistry**, v. 1, n. 1, p. 801–832, 2008.

LAHOGUE, V.; RÉHEL, K.; TAUPIN, L.; HARAS, D.; ALLAUME, P. A HPLC-UV method for the determination of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity. **Food Chemistry**, v. 118, n. 3, p. 870–875, 2010.

LEE, S. Y.; HUR, S. J. Antihypertensive peptides from animal products, marine organisms, and plants. **Food Chemistry**, v. 228, p. 506–517, 2017.

LI, Z.; PAULSON, A. T.; GILL, T. A. Encapsulation of bioactive salmon protein hydrolysates with chitosan-coated liposomes. **Journal of Functional Foods**, 19, p. 733-743, 2015.

LIU, W.; YE, A.; LIU, W.; LIU, C.; HAN, J.; SINGH, H. Behaviour of liposomes loaded with bovine serum albumin during in vitro digestion. **Food Chemistry**, v. 175, p. 16–24, 2015.

LIU, Y.; LI, X.; CHEN, Z.; YU, J.; WANG, F.; WANG, J. Characterization of structural and functional properties of fish protein hydrolysates from surimi processing by-products. **Food Chemistry**, v. 151, p. 459–465, 2014.

MARTINI, N. D. N.; NURSYAM, H.; FADJAR, M. The Effects of Different Intensive Culture Systems on White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Muscle Protein Pattern. v. 5, n. 4, p. 97–101, 2015.

MOHAN, A.; MCCLEMENTS, D. J.; UDENIGWE, C. C. Encapsulation of bioactive whey peptides in soy lecithin-derived nanoliposomes: Influence of peptide molecular weight. **Food Chemistry**, v. 213, p. 143–148, 2016.

MOHAN, A.; RAJENDRAN, S. R. C. K.; HE, Q. S.; BAZINET, L.; UDENIGWE, C. C.

Encapsulation of food protein hydrolysates and peptides: a review. **RSC Advances**, v. 5, n. 97, p. 79270–79278, 2015.

MOHAN, A.; RAJENDRAN, S. R. C. K.; THIBODEAU, J.; BAZINET, L.; UDENIGWE, C. C. Liposome encapsulation of anionic and cationic whey peptides: Influence of peptide net charge on properties of the nanovesicles. **LWT - Food Science and Technology**, v. 87, p. 40–46, 2018.

MORAIS, H. A.; DA SILVA BARBOSA, C. M.; DELVIVO, F. M.; MANSUR, H. S.; DE OLIVEIRA, M. C.; SILVESTRE, M. P. C. Comparative study of microencapsulation of casein hydrolysates in lipospheres and liposomes. **Journal of Food Biochemistry**, v. 28, n. 1, p. 21–41, 2004.

MOSQUERA, M.; GIMÉNEZ, B.; DA SILVA, I. M.; BOELTER, J. F.; MONTERO, P.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; BRANDELLI, A. Nanoencapsulation of an active peptidic fraction from sea bream scales collagen. **Food Chemistry**, v. 156, p. 144–150, 2014.

MOSQUERA, M.; GIMÉNEZ, B.; MONTERO, P.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. Incorporation of liposomes containing squid tunic ACE-inhibitory peptides into fish gelatin. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 3, p. 769–776, 2016.

NALINANON, S.; BENJAKUL, S.; KISHIMURA, H.; SHAHIDI, F. Functionalities and antioxidant properties of protein hydrolysates from the muscle of ornate threadfin bream treated with pepsin from skipjack tuna. **Food Chemistry**, v. 124, n. 4, p. 1354–1362, 2011.

NGO, D. H.; RYU, B.; KIM, S. K. Active peptides from skate (*okamejei kenojei*) skin gelatin diminish angiotensin-i converting enzyme activity and intracellular free radical-mediated oxidation. **Food Chemistry**, v. 143, p. 246–255, 2014.

NGO, D.; VO, T.; RYU, B.; KIM, S. Angiotensin- I- converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from Pacific cod skin gelatin using ultrafiltration membranes. v. 51, p. 1622–1628, 2016.

NIKOO, M.; BENJAKUL, S. Potential application of seafood-derived peptides as bifunctional ingredients, antioxidant-cryoprotectant: A review. **Journal of Functional Foods**, v. 19, p. 753–764, 2015.

OKAMOTO, Y.; TAGUCHI, K.; YAMASAKI, K.; SAKURAGI, M.; KURODA, S.; OTAGIRI, M. Albumin-Encapsulated Liposomes: A Novel Drug Delivery Carrier With Hydrophobic Drugs Encapsulated in the Inner Aqueous Core. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 107, n. 1, p. 436–445, 2018.

RAFIEE, Z.; BARZEGAR, M.; SAHARI, M. A.; MAHERANI, B. Nanoliposomal carriers for improvement the bioavailability of high – valued phenolic compounds of pistachio green hull extract. **Food Chemistry**, v. 220, p. 115–122, 2017.

RAMEZANZADE, L.; HOSSEINI, S. F.; NIKKHAH, M. Biopolymer-coated nanoliposomes as carriers of rainbow trout skin-derived antioxidant peptides. **Food Chemistry**, v. 234, p. 220–229, 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.

SAADI, S.; SAARI, N.; ANWAR, F.; HAMID, A. A.; GHAZALI, H. M. Recent advances in food biopeptides: Production, biological\nfunctionalities and therapeutic applications.

Biotechnology Advances, v. 33, n. 1, p. 80–116, 2015.

SAIGA, A.; OKUMURA, T.; MAKIHARA, T.; KATSUDA, S.-I.; MORIMATSU, F.; NISHIMURA, T. Action Mechanism of an Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptide Derived from Chicken Breast Muscle. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 3, p. 942–945, 2006.

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

SIMPSON, B. K.; NAYERI, G.; YAYLAYAN, V.; ASHIE, I. N. A. Enzymatic Hydrolysis of Shrimp Meat. **Food Chemistry**, v. 61, n. 1, p. 131–138, 1998.

TEIXEIRA, M. L.; DOS SANTOS, J.; SILVEIRA, N. P.; BRANDELLI, A. Phospholipid nanovesicles containing a bacteriocin-like substance for control of Listeria monocytogenes. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 9, n. 1, p. 49–53, 2008.

UDENIGWE, C. C. Bioinformatics approaches, prospects and challenges of food bioactive peptide research. **Trends in Food Science and Technology**, v. 36, n. 2, p. 137–143, 2014.

WEN, P.; ZONG, M. H.; LINHARDT, R. J.; FENG, K.; WU, H. Electrospinning: A novel nano-encapsulation approach for bioactive compounds. **Trends in Food Science and Technology**, v. 70, n. October, p. 56–68, 2017.

WU, J. Improved method for direct high-performance liquid chromatography assay of angiotensin-converting enzyme-catalyzed reactions. **Journal of Chromatography A**, v. 15, n. 950, p. 125–130, 2002.

ZAMORA-SILLERO, J.; RAMOS, P.; MONSERRAT, J. M.; PRENTICE, C. Evaluation of the Antioxidant Activity *In Vitro* and in Hippocampal HT-22 Cells System of Protein Hydrolysates of Common Carp (*Cyprinus carpio*) By-Product. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 27, n. 1, p. 21–34, 2018.

ZAVAREZE, E. R.; TELLES, A. C.; MELLO EL HALAL, S. L.; DA ROCHA, M.; COLUSSI, R.; MARQUES DE ASSIS, L.; SUITA DE CASTRO, L. A.; GUERRA DIAS, A. R.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Production and characterization of encapsulated antioxidative protein hydrolysates from Whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*) muscle and byproduct. **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, n. 2P1, p. 841–848, 2014.

ZHANG, J.; ZHANG, H.; WANG, L.; GUO, X.; WANG, X.; YAO, H. Isolation and identification of antioxidative peptides from rice endosperm protein enzymatic hydrolysate by consecutive chromatography and MALDI-TOF/TOF MS/MS. **Food Chemistry**, v. 119, n. 1, p. 226–234, 2010.

ZOGHI, A.; KHOSRAVI-DARANI, K.; OMRI, A. Process Variables and Design of Experiments in Liposome and Nanoliposome Research. **Medicinal Chemistry**, p. 1–16, 2016.

CAPÍTULO IV

CONCLUSÃO GERAL

CONCLUSÃO GERAL

O processo de hidrólise enzimática das proteínas do camarão branco obtido utilizando as enzimas s Alcalase e Protamex, permitiu a obtenção de compostos naturais com excelentes propriedades funcionais e bioativas, podendo ser inseridos na formulação de alimentos funcionais e/ou alimentos nutracêuticos. Os hidrolisados e frações peptídicas de camarão surgem como compostos naturais alternativos aos compostos sintéticos, devido as suas propriedades diferenciadas, com ênfase nas atividades antioxidante, antimicrobiana, antitumoral e anti-hipertensiva. Além disso, o presente trabalho permitiu concluir que o fracionamento dos peptídeos influenciou nas propriedades bioativas testadas e que o processo de encapsulação por lipossomas oferece a obtenção de nanocápsulas peptídicas de camarão branco com elevada estabilidade e baixo índice de polidispersão. Finalmente foi comprovado que as frações peptídicas obtidas pela hidrólise com a enzima Protamex não tiveram sua bioatividade afetada pelo encapsulamento.

CAPÍTULO V

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABCC. **Associação Brasileira de Criação de Camarões**. Disponível em: <http://abccam.com.br/site/category/s1-abcc/c5-estatisticas/>. Acesso em: 18 de jan. 2018.

ABDEL-SALAM, H. A. Evaluation of Nutritional Quality of Commercially Cultured Indian White Shrimp Penaeus indicus. **International Journal of Nutrition and Food Sciences**, v. 2, n. 4, p. 160, 2013.

ABDELHEDI, O.; JRIDI, M.; JEMIL, I.; MORA, L.; TOLDRÁ, F.; ARISTOY, M. C.; BOUALGA, A.; NASRI, M.; NASRI, R. Combined biocatalytic conversion of smooth hound viscera: Protein hydrolysates elaboration and assessment of their antioxidant, anti-ACE and antibacterial activities. **Food Research International**, v. 86, p. 9–23, 2016.

ABEJÓN, R.; BELLEVILLE, M. P.; SANCHEZ-MARCANO, J.; GAREA, A.; IRABIEN, A. Optimal design of industrial scale continuous process for fractionation by membrane technologies of protein hydrolysate derived from fish wastes. **Separation and Purification Technology**, v. 197, p. 137–146, 2018.

ABIDI, F.; AISSAOUI, N.; GAUDIN, J. C.; CHOBERT, J. M.; HAERTLÉ, T.; MARZOUKI, M. N. Analysis and molecular characterization of botrytis cinerea protease prot-2. use in bioactive peptides production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 170, n. 2, p. 231–247, 2013.

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

AGUILAR, J. G. DOS S.; SATO, H. H. Microbial proteases: Production and application in obtaining protein hydrolysates. **Food Research International**, v. 103, p. 253–262, 2018.

AGYEI, D.; ONGKUDON, C. M.; WEI, C. Y.; CHAN, A. S.; DANQUAH, M. K. Bioprocess challenges to the isolation and purification of bioactive peptides. **Food and Bioproducts Processing**, v. 98, p. 244–256, 2016.

ALAM, M. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, n. 2, p. 143–152, 2013.

ALEMÁN, A.; PÉREZ-SANTÍN, E.; BORDENAVE-JUCHEREAU, S.; ARNAUDIN, I.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; MONTERO, P. Squid gelatin hydrolysates with antihypertensive, anticancer and antioxidant activity. **Food Research International**, v. 44, n. 4, p. 1044–1051, 2011.

ALLEN, T. M.; CULLIS, P. R. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 1, p. 36–48, 2013.

ALMATAR, M.; MAKKY, E. A.; YAKICI, G.; VAR, I.; KAYAR, B.; KÖKSAL, F. Antimicrobial peptides as an alternative to anti-tuberculosis drugs. **Pharmacological Research**, v. 128, p. 288-305, 2017.

AMADO, I. R.; VÁZQUEZ, J. A.; GONZÁLEZ, M. P.; MURADO, M. A. Production of antihypertensive and antioxidant activities by enzymatic hydrolysis of protein concentrates recovered by ultrafiltration from cuttlefish processing wastewaters. **Biochemical Engineering Journal**, v. 76, p. 43–54, 2013.

AMBIGAIPALAN, P.; SHAHIDI, F. Bioactive peptides from shrimp shell processing discards: Antioxidant and biological activities. **Journal of Functional Foods**, v. 34, p. 7–17, 2017.

AMIGHI, F.; EMAM-DJOMEH, Z.; MADADLOU, A. Spray drying of ACE-inhibitory enzyme-modified white cheese. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 48, n. 11, p. 2276–2282, 2013.

AMIGHI, F.; EMAM-DJOMEH, Z.; MADADLOU, A. Optimised production and spray drying of ACE-inhibitory enzyme-modified cheese. **Journal of Dairy Research**, v. 83, n. 1, p. 125–134, 2016.

ANDERSON, G. H.; MOORE, S. E. The emerging role of dairy proteins and bioactive peptides in nutrition and health dietary proteins in the regulation of food intake and body weight in humans. **Journal of Nutrition**, v. 134, n. 4, p. 974–979, 2004.

ARANCIBIA, M. Y.; ALEMÁN, A.; CALVO, M. M.; LÓPEZ-CABALLERO, M. E.; MONTERO, P.; GÓMEZ-GUILLEN, M. C. Antimicrobial and antioxidant chitosan solutions enriched with active shrimp (*Litopenaeus vannamei*) waste materials. **Food Hydrocolloids**, v. 35, p. 710–717, 2014.

ARANCIBIA, M. Y.; LÓPEZ-CABALLERO, M. E.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; MONTERO, P. Chitosan coatings enriched with active shrimp waste for shrimp preservation. **Food Control**, v. 54, p. 259–266, 2015.

ARAUJO, D. F. D. S.; SILVESTRE, D. D.; DAMASCENO, K. S. F. D. S. C.; PEDROSA, L. D. F. C.; SEABRA, L. M. A. J. Composição centesimal e teor de colesterol do camarão branco do Pacífico. **Ciência Rural**, v. 42, n. 6, p. 1130–1133, 2012.

ARRUTIA, F.; RUBIO, R.; RIERA, F. A. Production and membrane fractionation of bioactive peptides from a whey protein concentrate. **Journal of Food Engineering**, v. 184, p. 1–9, 2016.

ARUOMA, O. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 75, n. 2, p. 199–212, 1998.

ARYEE, A. N. A.; AGYEI, D.; UDENIGWE, C. C. **Impact of processing on the chemistry and functionality of food proteins**. Second Edi ed. [s.l.] Elsevier Ltd., 2018.

AVNIMELECH, Y. Carbonrnitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. **Aquaculture**, v. 176, n. February, p. 227–235, 1999.

AWAD, S.; EL-SAYED, M. I.; WAHBA, A.; EL-ATTAR, A.; M.I.YOUSEF; M.ZEDAN. Antioxidant activity of milk protein hydrolysate in alloxan-induced diabetic rats. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 11, p. 8499–8510, 2016.

AZAMBUJA, C. R. L.; DOS SANTOS, L. G.; RODRIGUES, M. R.; RODRIGUES, R. F.

M.; DA SILVEIRA, E. F.; AZAMBUJA, J. H.; FLORES, A. F. C.; HORN, A. P.; DORA, C. L.; MUCCILLO-BAISCH, A. L.; BRAGANHOL, E.; DA SILVA PINTO, L.; PARIZE, A. L.; DE LIMA, V. R. Physico-chemical characterization of asolectin-genistein liposomal system: An approach to analyze its in vitro antioxidant potential and effect in glioma cells viability. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 193, p. 24–35, 2015.

AZEREDO, H. M. C.; DIVISION, C.; ESTEVINHO, B. N.; ROCHA, F.; SANTOS, L.; ALVES, A.; DE AZEREDO, H. M. C.; AZEREDO, H. M. C. Drying technology : An international journal. **Alimentação e Nutrição, Araraquara**, v. 16, n. 1, p. 89–97, 2005.

BAHARUDDIN, N. A.; HALIM, N. R. A.; SARBON, N. M. Effect of degree of hydrolysis (DH) on the functional properties and angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity of eel (*Monopterus sp.*) protein hydrolysate. **International Food Research Journal**, v. 23, n. 4, p. 1424–1431, 2016.

BAKER, P. J.; NUMATA, K. Polymerization of Peptide Polymers for Biomaterial Applications Chapter. In: **World largest Science , Technology & Medicine**. [s.l.] INTECH, 2013. p. 229–246.

BAKER, R. Controlled release of biologically active agents. **New York: John Wiley & Sons**, p. 206–214, 1986.

BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, n. 2, p. 71–79, 2016.

BEAULIEU, L.; BONDU, S.; DOIRON, K.; RIOUX, L. E.; TURGEON, S. L. Characterization of antibacterial activity from protein hydrolysates of the macroalga Saccharina longicruris and identification of peptides implied in bioactivity. **Journal of Functional Foods**, v. 17, p. 685–697, 2015.

BEAULIEU, L.; THIBODEAU, J.; BONNET, C.; BRYL, P.; CARBONNEAU, M. É. Detection of antibacterial activity in an enzymatic hydrolysate fraction obtained from processing of Atlantic rock crab (*Cancer irroratus*) by-products. **PharmaNutrition**, v. 1, n. 4, p. 149–157, 2013.

BECKER, E. M.; NISSEN, L. R.; SKIBSTED, L. H. Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. **European Food Research and Technology**, v. 219, n. 6, p. 561–571, 2004.

BKHAIRIA, I.; BEN SLAMA BEN SALEM, R.; NASRI, R.; JRIDI, M.; GHORBEL, S.; NASRI, M. In-vitro antioxidant and functional properties of protein hydrolysates from golden grey mullet prepared by commercial, microbial and visceral proteases. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 7, p. 2902–2912, 2016.

BLANCO-MÍGUEZ, A.; GUTIÉRREZ-JÁCOME, A.; PÉREZ-PÉREZ, M.; PÉREZ-RODRÍGUEZ, G.; CATALÁN-GARCÍA, S.; FDEZ-RIVEROLA, F.; LOURENÇO, A.; SÁNCHEZ, B. From amino acid sequence to bioactivity: The biomedical potential of antitumor peptides. **Protein Science**, v. 25, n. 6, p. 1084–1095, 2016.

BLANCO, A.; BRESSANI, R. Biodisponibilidad de aminoácidos in el frijol (*Plhaseolus vulgaris*). **Archivos Latinoamericano de Nutrición**, v. 41, p. 38–51, 1991.

BONO, G.; OKPALA, C. O. R.; ALBERIO, G. R. A.; MESSINA, C. M.; SANTULLI, A.; GIACALONE, G.; SPAGNA, G. Toward shrimp consumption without chemicals: Combined effects of freezing and modified atmosphere packaging (MAP) on some quality characteristics of Giant Red Shrimp (*Aristaeomorpha foliacea*) during storage. **Food Chemistry**, v. 197, p. 581–588, 2016.

BORAWSKA, J.; DAREWICZ, M.; VEGARUD, G. E.; MINKIEWICZ, P. Antioxidant properties of carp (*Cyprinus carpio L.*) protein ex vivo and in vitro hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 194, p. 770–779, 2016.

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

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

BROWN, K. L.; HANCOCK, R. E. W. Cationic host defense (antimicrobial) peptides. **Current Opinion in Immunology**, v. 18, n. 1, p. 24–30, 2006.

BURFORD, M. A.; THOMPSON, P. J.; MCINTOSH, R. P.; BAUMAN, R. H.; PEARSON, D. C. The contribution of flocculated material to shrimp (*Litopenaeus vannamei*) nutrition in a high-intensity, zero-exchange system. **Aquaculture**, v. 232, n. 1–4, p. 525–537, 2004.

BUTTERFIELD, D. A.; CASTEGNA, A.; POCERNICH, C. B.; DRAKE, J.; SCAPAGNINI, G.; CALABRESE, V. Nutritional approaches to combat oxidative stress in Alzheimer's disease. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, n. 8, p. 444–461, 2002.

CAI, L.; WU, X.; ZHANG, Y.; LI, X.; MA, S.; LI, J. Purification and characterization of three antioxidant peptides from protein hydrolysate of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin. **Journal of Functional Foods**, v. 16, p. 234–242, 2015.

CELLI, G. B.; GHANEM, A.; BROOKS, M. S. L. Bioactive encapsulated powders for functional foods—a review of methods and current limitations. **Food and Bioprocess Technology**, v. 8, n. 9, p. 1825–1837, 2015.

CENTENARO, G. S.; MELLADO, M. S.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Antioxidant activity of protein hydrolysates of fish and chicken bones. **Advance Journal of Food Science and Technology**, v. 3, n. 4, p. 280–288, 2011.

CENTENARO, G. S.; SALAS-MELLADO, M.; PIRES, C.; BATISTA, I.; NUNES, M. L.; PRENTICE, C. Fractionation of protein hydrolysates of fish and chicken using membrane ultrafiltration: Investigation of antioxidant activity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 6, p. 2877–2893, 2014.

CHALAMAIAH, M.; DINESH KUMAR, B.; HEMALATHA, R.; JYOTHIRMAYI, T. Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review. **Food Chemistry**, v. 135, n. 4, p. 3020–3038, 2012.

CHALAMAIAH, M.; YU, W.; WU, J. Immunomodulatory and anticancer protein hydrolysates (peptides) from food proteins: A review. **Food Chemistry**, v. 245, p. 205–222, 2018.

CHAN, D. I.; PRENNER, E. J.; VOGEL, H. J. Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: Structures and mechanisms of action. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1758, n. 9, p. 1184–1202, 2006.

CHAY, S. Y.; TAN, W. K.; SAARI, N. Preparation and characterisation of nanoliposomes containing winged bean seeds bioactive peptides. **Journal of Microencapsulation**, v. 32, n. 5, p. 488–495, 2015.

CHEN, C.; CHI, Y. J.; ZHAO, M. Y.; XU, W. Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant and ACE inhibitory activities of egg white protein hydrolysate. **Food Science and Biotechnology**, v. 21, n. 1, p. 27–34, 2012.

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.

CHEUNG, I. W. Y.; LI-CHAN, E. C. Y. Application of taste sensing system for characterisation of enzymatic hydrolysates from shrimp processing by-products. **Food Chemistry**, v. 145, p. 1076–1085, 2014.

CHI, C.; CAO, Z.; HU, F.; LI, Z.; ZHANG, B. Antioxidant and functional properties of collagen hydrolysates from Spanish mackerel skin as influenced by average molecular weight. **Molecules**, v. 19, n. 8, p. 11211–11230, 2014a.

CHI, C. F.; HU, F. Y.; WANG, B.; LI, T.; DING, G. F. Antioxidant and anticancer peptides from the protein hydrolysate of blood clam (*Tegillarca granosa*) muscle. **Journal of Functional Foods**, v. 15, p. 301–313, 2015.

CHI, C. F.; WANG, B.; DENG, Y. Y.; WANG, Y. M.; DENG, S. G.; MA, J. Y. Isolation and characterization of three antioxidant pentapeptides from protein hydrolysate of monkfish (*Lophius litulon*) muscle. **Food Research International**, v. 55, p. 222–228, 2014b.

CHO, D. Y.; JO, K.; CHO, S. Y.; KIM, J. M.; LIM, K.; SUH, H. J.; OH, S. Antioxidant effect and functional properties of hydrolysates derived from egg-white protein. **Korean Journal for Food Science of Animal Resources**, v. 34, n. 3, p. 362–371, 2014.

CHUN, J. Y.; MIN, S. G.; JO, Y. J. Production of low molecular collagen peptides-loaded liposomes using different charged lipids. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 209, p. 1–8, 2017.

CLEMENTE, A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. **Trends in Food Science and Technology**, v. 11, n. 7, p. 254–262, 2001.

CLSI. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests ; approved atandard**. [s.l: s.n.]. v. 32, 2012.

COELHO, M. S.; SALAS-MELLADO, M. M. Alegación de salud de las proteínas de semilla de chia: actividad antioxidant. **La Alimentación Latinoamericana**, v. 334, p. 64–69, 2017.

CONTRERAS-GUZMÁN, E. S. **Bioquímica de Pescado e Derivados**. Jaboticabal: FUNEP, 1994.

CORTEZ-VEGA, W. R.; FONSECA, G. G.; BAGATINI, D. C.; PRENTICE, C. Influence of adding recovered protein from processing wastewater on the quality of mechanically separated chicken meat surimi like-material. **Korean Journal for Food Science of Animal Resources**, v. 37, n. 2, p. 162–167, 2017.

CUSHMAN, D.; CHEUNG, H. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin converting enzyme of rabbit lung. **Biochem Pharmacol**, v. 29, p. 1637,1648, 1971.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

DE ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; BARRETT REINA, L. D. C.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L.; LOPES, M. T. P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: Uma introdução. **Quimica Nova**, v. 28, n. 1, p. 118–129, 2005.

DE HOLANDA, H. D.; NETTO, F. M. Recovery of components from shrimp (*Xiphopenaeus kroyeri*) processing waste by enzymatic hydrolysis. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 5, 2006.

DE SOUZA, D. M.; BORGES, V. D.; FURTADO, P.; ROMANO, L. A.; WASIELESKY, W.; MONSERRAT, J. M.; DE OLIVEIRA GARCIA, L. Antioxidant enzyme activities and immunological system analysis of *Litopenaeus vannamei* reared in biofloc technology (BFT) at different water temperatures. **Aquaculture**, v. 451, p. 436–443, 2016.

DEMARCO, F. F.; TARQUINIO, S. B. C. C.; JAEGER, M. M. M.; MATSON, E. Evaluation of the cytotoxicity of two dentin-bonding systems. **Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo**, v. 12, n. 4, p. 375–382, 1998.

DEY, S. S.; DORA, K. C. Antioxidative activity of protein hydrolysate produced by alcalase hydrolysis from shrimp waste (*Penaeus monodon and Penaeus indicus*). **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 3, p. 449–457, 2014a.

DEY, S. S.; DORA, K. C. Optimization of the production of shrimp waste protein hydrolysate using microbial proteases adopting response surface methodology. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 1, p. 16–24, 2014b.

DOS SANTOS, S. D. A.; MARTINS, V. G.; SALAS-MELLADO, M.; PRENTICE, C. Evaluation of functional properties in protein hydrolysates from Bluewing Searobin (*Prionotus punctatus*) obtained with different microbial enzymes. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, n. 8, p. 1399–1406, 2011.

EBENHAN, T.; GHEYSENS, O.; KRUGER, H. G.; ZEEVAART, J. R.; SATHEKGE, M. M. Antimicrobial peptides: Their role as infection-selective tracers for molecular imaging. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–15, 2014.

EGERTON, S.; CULLOTY, S.; WHOOLEY, J.; STANTON, C.; ROSS, R. P. Characterization of protein hydrolysates from blue whiting (*Micromesistius poutassou*) and their application in beverage fortification. **Food Chemistry**, v. 245, p. 698–706, 2018.

EJIKE, C. E. C. C.; COLLINS, S. A.; BALASURIYA, N.; SWANSON, A. K.; MASON, B.; UDENIGWE, C. C. Prospects of microalgae proteins in producing peptide-based functional foods for promoting cardiovascular health. **Trends in Food Science and Technology**, v. 59, p. 30–36, 2017.

ENNAAS, N.; HAMMAMI, R.; BEAULIEU, L.; FLISS, I. Production of antibacterial fraction from Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*) and its processing by-products using commercial enzymes. **Food and Bioproducts Processing**, v. 96, p. 145–153, 2015.

ESPEJO-CARPIO, F. J.; GUADIX, A.; GUADIX, E. M. Spray drying of goat milk protein hydrolysates with angiotensin converting enzyme inhibitory activity. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, n. 8, p. 2388–2396, 2014.

EVANGELHO, J. A. DO; VANIER, N. L.; PINTO, V. Z.; BERRIOS, J. J. D.; DIAS, A. R. G.; ZAVAREZE, E. DA R. Black bean (*Phaseolus vulgaris L.*) protein hydrolysates: Physicochemical and functional properties. **Food Chemistry**, v. 214, p. 460–467, 2017.

EZHILARASI, P. N.; KARTHIK, P.; CHHANWAL, N.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Nanoencapsulation techniques for food bioactive components: A review. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 3, p. 628–647, 2013.

FAGUNDES, G. A.; ROCHA, M.; SALAS-MELLADO, M. M. Improvement of protein content and effect on technological properties of wheat. Food Research, v. p, p. pp-pp, 2018.

FANG, Z.; BHANDARI, B. Encapsulation of polyphenols - A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 21, n. 10, p. 510–523, 2010.

FAO. **The state of world fisheries and aquaculture**. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 2014.

FARVIN, K. H. S.; ANDERSEN, L. L.; NIELSEN, H. H.; JACOBSEN, C.; JAKOBSEN, G.; JOHANSSON, I.; JESSEN, F. Antioxidant activity of Cod (*Gadus morhua*) protein hydrolysates: In vitro assays and evaluation in 5% fish oil-in-water emulsion. **Food Chemistry**, v. 149, p. 326–334, 2014.

FARVIN, K. H. S.; ANDERSEN, L. L.; OTTE, J.; NIELSEN, H. H.; JESSEN, F.; JACOBSEN, C. Antioxidant activity of cod (*Gadus morhua*) protein hydrolysates: Fractionation and characterisation of peptide fractions. **Food Chemistry**, v. 204, p. 409–419, 2016.

FATHI, M.; MOZAFARI, M. R.; MOHEBBI, M. Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. **Trends in Food Science and Technology**, v. 23, n. 1, p. 13–27, 2012.

FITZGERALD, R. J.; O'CUINN, G. Enzymatic debittering of food protein hydrolysates. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 2, p. 234–237, 2006.

FOEX, P.; SEAR, J. Hypertension: pathophysiology and treatment. **Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain**, v. 4, p. 71–75, 2004.

FONSECA, R. A. S.; SILVA, C. M.; ROSA, G. F.; PRENTICE, C. Peptides obtained from proteins of cobia (*Rachycentron canadum*): A study of potentially safe antioxidants for food.

International Food Research Journal, v. 24, n. 6, p. 2500–2508, 2017.

FORSTER, C. F. Bioflocculation in the activated sludge process. **Water S.A.**, v. 2, n. 3, p. 119–125, 1976.

FU, Y.; ZHAO, X. H. In vitro responses of hFOB1.19 cells towards chum salmon (*Oncorhynchus keta*) skin gelatin hydrolysates in cell proliferation, cycle progression and apoptosis. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 1, p. 279–288, 2013.

GALVÃO, J. A.; OETTERER, M. **Qualidade e Processamento de Pescado**. 1. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

GHORBANZADE, T.; JAFARI, S. M.; AKHAVAN, S.; HADAVI, R. Nano-encapsulation of fish oil in nano-liposomes and its application in fortification of yogurt. **Food Chemistry**, v. 216, p. 146–152, 2017.

GIBIS, M.; ZEEB, B.; WEISS, J. Formation, characterization, and stability of encapsulated hibiscus extract in multilayered liposomes. **Food Hydrocolloids**, v. 38, p. 28–39, 2014.

GIRGIH, A. T.; UDENIGWE, C. C.; HASAN, F. M.; GILL, T. A.; ALUKO, R. E. Antioxidant properties of Salmon (*Salmo salar*) protein hydrolysate and peptide fractions isolated by reverse-phase HPLC. **Food Research International**, v. 52, n. 1, p. 315–322, 2013.

GOBBETTI, M.; MINERVINI, F.; RIZZELLO, C. G. Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antimicrobial bioactive peptides. **International Journal of Dairy Technology**, v. 57, n. 2–3, p. 173–188, 2004.

GÓMEZ-GUILLÉN, G.; LÓPEZ CABALLERO, M. E.; ALEMÁN, A.; LÓPEZ DE LACEY, A., GIMÉNEZ, B.; MONTERO, P. Antioxidant and antimicrobial peptide fractions from squid and tuna skin gelatin. **Sea by-products as real material**, v. 661, n. 2, p. 89–115, 2010.

GONÇALVES, A. A. **Tecnologia do Pescado - Ciência, Tecnologia, Inovação e Legislação.** 1. ed. Porto Alegre: Atheneu, 2011.

GOYAL, P.; GOYAL, K.; K., V.; SINGH, A.; OP, K.; DN, M. Liposomal drug delivery systems--clinical applications. **Acta Pharm**, v. 55, p. 1–25, 2005.

GRANATO, D.; NUNES, D. . **Análises Químicas, Propriedades Funcionais e Controle de Qualidade de Alimentos e Bebidas**. 1. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

GRIENKE, U.; SILKE, J.; TASDEMIR, D. Bioactive compounds from marine mussels and their effects on human health. **Food Chemistry**, v. 142, p. 48–60, 2014.

GU, Y.; WU, J. The potential of antioxidative and anti-inflammatory peptides in reducing the risk of cardiovascular diseases. **Current Opinion in Food Science**, v. 8, p. 25–32, 2016.

GUNASEKARAN, J.; KANNUCHAMY, N.; KANNAIYAN, S.; CHAKRABORTI, R.; GUDIPATI, V. Protein Hydrolysates from Shrimp (*Metapenaeus dobsoni*) Head Waste: Optimization of Extraction Conditions by Response Surface Methodology. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 24, n. 5, p. 429–442, 2015.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

HALIM, N. R. A.; YUSOF, H. M.; SARBON, N. M. Functional and bioactive properties of fish protein hydolysates and peptides: A comprehensive review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 51, p. 24–33, 2016.

HALL, J. E.; GRANGER, J. P.; DO CARMO, J. M.; DA SILVA, A. A.; DUBINION, J.; GEORGE, E.; HAMZA, S.; SPEED, J.; HALL, M. E. Hypertension: Physiology and pathophysiology. **Comprehensive Physiology**, v. 2, n. 4, p. 2393–2442, 2012.

HAMZEH, A.; BENJAKUL, S.; SENPHAN, T. Comparative study on antioxidant activity of hydrolysates from splendid squid (*Loligo formosana*) gelatin and protein isolate prepared using protease from hepatopancreas of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 9, p. 3615–3623, 2016.

HANCOCK, R. E.; G. DIAMOND. The role of cationic antimicrobial peptides ininnate host defences. **Trends in Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 402–410, 2000.

HARNEDY, P. A.; FITZGERALD, R. J. Bioactive peptides from marine processing waste and shellfish: A review. **Journal of Functional Foods**, v. 4, n. 1, p. 6–24, 2012.

HARNEDY, P. A.; PARTHSARATHY, V.; MCLAUGHLIN, C. M.; O'KEEFFE, M. B.; ALLSOPP, P. J.; MCSORLEY, E. M.; O'HARTE, F. P. M.; FITZGERALD, R. J. Blue whiting (*Micromesistius poutassou*) muscle protein hydrolysate with in vitro and in vivo antidiabetic properties. **Journal of Functional Foods**, v. 40, p. 137–145, 2018.

HASLANIZA, H.; MASKAT, M. Y.; WAN AIDA, W. M.; MAMOT, S. The effects of enzyme concentration, temperature and incubation time on nitrogen content and degree of hydrolysis of protein precipitate from cockle (*Anadara granosa*) meat wash water. **International Food Research Journal**, v. 17, n. 1, p. 147–152, 2010.

HATAB, S.; CHEN, M.; MIAO, W.; LIN, J.; WU, D.; WANG, C.; YUAN, P.; DENG, S. Protease hydrolysates of filefish (*Thamnaconus modestus*) byproducts effectively inhibit foodborne pathogens. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 14, n. 11, p. 656–666, 2017.

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.

HE, S.; NGUYEN, T. T.; SU, P.; ZHANG, W. Protein hydrolysates produced from rock lobster (*Jasus edwardsii*) Head: emulsifying capacity and food safety. **Food Science and Nutrition**, v. 4, n. 6, p. 869–877, 2016.

HERNANDEZ-LEDESMA, B.; CHIA-CHIEN, H. **Bioactive Food Peptides in Health and Disease**. Jarneza: INTECH, 2013.

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; DEL MAR CONTRERAS, M.; RECIO, I. Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into foods. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 165, n. 1, p. 23–35, 2011.

HOLTHUIS, L. B.; WORLD, O. F. T. H. E. An Annotated Catalogue of Species. **Fao**

Fisheries Synopsis, v. 1, n. 125, p. 284, 1980.

HOSSEINI, S. F.; RAMEZANZADE, L.; NIKKHAH, M. Nano-liposomal entrapment of bioactive peptidic fraction from fish gelatin hydrolysate. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 105, p. 1455–1463, 2017.

HSU, K. C.; LI-CHAN, E. C. Y.; JAO, C. L. Antiproliferative activity of peptides prepared from enzymatic hydrolysates of tuna dark muscle on human breast cancer cell line MCF-7. **Food Chemistry**, v. 126, n. 2, p. 617–622, 2011.

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, G. R.; REN, Z. Y.; JIANG, J. X. Optimization of Hydrolysis Conditions for Iron Binding Peptides Production from Shrimp Processing Byproducts. **American Journal of Food Technology**, v. 9, n. 1, p. 49–55, 2014.

HUANG, Y. -B.; WANG, X. -F.; WANG, H. -Y.; LIU, Y.; CHEN, Y. Studies on Mechanism of Action of Anticancer Peptides by Modulation of Hydrophobicity Within a Defined Structural Framework. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 10, n. 3, p. 416–426, 2011.

HUNG, C. C.; YANG, Y. H.; KUO, P. F.; HSU, K. C. Protein hydrolysates from tuna cooking juice inhibit cell growth and induce apoptosis of human breast cancer cell line MCF-7. **Journal of Functional Foods**, v. 11, n. C, p. 563–570, 2014.

ICTIO TERM. **Base de datos terminológicos y de identificación de especies pesqueras de las costas de Andalucía.** Disponível em: <http://www.ictioterm.es/nombre_cientifico.php?nc=235>. Acesso em: 10 jan. 2018.

INCA. **Câncer**. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=317>. Acesso em: 4 fev. 2018.

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

INTARASIRISAWAT, R.; BENJAKUL, S.; WU, J.; VISESSANGUAN, W. Isolation of antioxidative and ACE inhibitory peptides from protein hydrolysate of skipjack (*Katsuwana pelamis*) roe. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 4, p. 1854–1862, 2013.

ISHAK, N. H.; SARBON, N. M. A Review of Protein Hydrolysates and Bioactive Peptides Deriving from Wastes Generated by Fish Processing. **Food and Bioprocess Technology**, v. 11, n. 1, p. 2–16, 2018.

JAFARI, S. M. **Nanoencapsulation Technologies for the Food and Nutraceutical Industries**. 1 ed. London: Elsevier, 2017.

JAIN, S.; ANAL, A. K. Production and characterization of functional properties of protein hydrolysates from egg shell membranes by lactic acid bacteria fermentation. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 5, p. 1062–1072, 2017.

JANG, H. L.; LICEAGA, A. M.; YOON, K. Y. Purification, characterisation and stability of

an antioxidant peptide derived from sandfish (*Arctoscopus japonicus*) protein hydrolysates. **Journal of Functional Foods**, v. 20, p. 433–442, 2016.

JEMIL, I.; ABDELHEDI, O.; MORA, L.; NASRI, R.; ARISTOY, M. C.; JRIDI, M.; HAJJI, M.; TOLDRÁ, F.; NASRI, M. Peptidomic analysis of bioactive peptides in zebra blenny (*Salaria basilisca*) muscle protein hydrolysate exhibiting antimicrobial activity obtained by fermentation with Bacillus mojavensis A21. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 12, p. 2186–2197, 2016.

JEMIL, I.; ABDELHEDI, O.; NASRI, R.; MORA, L.; JRIDI, M.; ARISTOY, M. C.; TOLDRÁ, F.; NASRI, M. Novel bioactive peptides from enzymatic hydrolysate of Sardinelle (*Sardinella aurita*) muscle proteins hydrolysed by Bacillus subtilis A26 proteases. **Food Research International**, v. 100, n. June, p. 121–133, 2017.

JEMIL, I.; JRIDI, M.; NASRI, R.; KTARI, N.; BEN SLAMA-BEN SALEM, R.; MEHIRI, M.; HAJJI, M.; NASRI, M. Functional, antioxidant and antibacterial properties of protein hydrolysates prepared from fish meat fermented by Bacillus subtilis A26. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 6, p. 963–972, 2014.

JEON, S.; YOO, C. Y.; PARK, S. N. Improved stability and skin permeability of sodium hyaluronate-chitosan multilayered liposomes by Layer-by-Layer electrostatic deposition for quercetin delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 129, p. 7–14, 2015.

JESORKA, A.; ORWAR, O. Liposomes: Technologies and Analytical Applications. **Annual Review of Analytical Chemistry**, v. 1, n. 1, p. 801–832, 2008.

JIANG, H.; TONG, T.; SUN, J.; XU, Y.; ZHAO, Z.; LIAO, D. Purification and characterization of antioxidative peptides from round scad (*Decapterus maruadsi*) muscle protein hydrolysate. **Food Chemistry**, v. 154, p. 158–163, 2014.

JUMERI; KIM, S. M. Antioxidant and anticancer activities of enzymatic hydrolysates of solitary tunicate (*Styela clava*). **Food Science and Biotechnology**, v. 20, n. 4, p. 1075–1085, 2011.

KAMAU, S. M.; LU, R. The Effect of Enzymes and Hydrolysis Conditions on Degree of Hydrolysis and DPPH radical scavening activity of whey protein hydrolysates. **Current Research in Dairy Sciences**, v. 3, n. 1, p. 25–35, 2011.

KEARNEY, P. M.; WHELTON, M.; REYNOLDS, K.; MUNTNER, P.; WHELTON, P.; HE, J. Global burden of hypertension--analysis of worldwide data. **Lancet**, v. 365, p. 217–223, 2005.

KECHAOU, E. S.; DUMAY, J.; DONNAY-MORENO, C.; JAOUEN, P.; GOUYGOU, J. P.; BERGÉ, J. P.; AMAR, R. BEN. Enzymatic hydrolysis of cuttlefish (*Sepia officinalis*) and sardine (*Sardina pilchardus*) viscera using commercial proteases: Effects on lipid distribution and amino acid composition. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 107, n. 2, p. 158–164, 2009.

KIM, E. K.; JOUNG, H. J.; KIM, Y. S.; HWANG, J. W.; AHN, C. B.; JEON, Y. J.; MOON, S. H.; SONG, B. C.; PARK, P. J. Purification of a novel anticancer peptide from enzymatic hydrolysate of Mytilus coruscus. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 10, p. 1381–1387, 2012.

KIM, E. K.; KIM, Y. S.; HWANG, J. W.; LEE, J. S.; MOON, S. H.; JEON, B. T.; PARK, P. J. Purification and characterization of a novel anticancer peptide derived from Ruditapes philippinarum. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 7, p. 1086–1090, 2013.

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.

KLEEKAYAI, T.; HARNEDY, P. A.; O'KEEFFE, M. B.; POYARKOV, A. A.; CUNHANEVES, A.; SUNTORNSUK, W.; FITZGERALD, R. J. Extraction of antioxidant and ACE inhibitory peptides from Thai traditional fermented shrimp pastes. **Food Chemistry**, v. 176, p. 441–447, 2015.

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.

KO, J. Y.; KANG, N.; LEE, J. H.; KIM, J. S.; KIM, W. S.; PARK, S. J.; KIM, Y. T.; JEON, Y. J. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from an enzymatic hydrolysate of flounder fish (*Paralichthys olivaceus*) muscle as a potent anti-hypertensive agent. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 4, p. 535–541, 2016.

KO, S. C.; JANG, J.; YE, B. R.; KIM, M. S.; CHOI, I. W.; PARK, W. S.; HEO, S. J.; JUNG, W. K. Purification and molecular docking study of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from hydrolysates of marine sponge Stylotella aurantium. **Process Biochemistry**, v. 54, p. 180–187, 2017.

KOBBI, S.; NEDJAR, N.; CHIHIB, N.; BALTI, R.; CHEVALIER, M.; SILVAIN, A.; CHAABOUNI, S.; DHULSTER, P.; BOUGATEF, A. Synthesis and antibacterial activity of new peptides from Alfalfa RuBisCO protein hydrolysates and mode of action via a membrane damage mechanism against Listeria innocua. **Microbial Pathogenesis**, v. 115, n. September 2017, p. 41–49, 2018.

KRISTINSSON, H. G.; RASCO, B. A. Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 40, p. 43-81, 2000.

KRUMMENAUER, D.; SEIFERT JÚNIOR, C. A.; POERSCH, L. H.; FOES, G. K.; LARA, G. R. DE; WASIELESKY, W. Cultivo de camarões marinhos em sistema de bioflocos: análise da reutilização da água. **Atlântica**, v. 34, n. 2, p. 103–111, 2012.

KUPPUSAMY, A.; ULAGESAN, S. Antimicrobial activity of protein hydrolysate from marine molluscs babylonia spirata (Linnaeus, 1758). **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 6, n. 7, p. 73–77, 2016.

KÜSTER-BOLUDA, I.; VIDAL-CAPILLA, I. Consumer attitudes in the election of functional foods. **Spanish Journal of Marketing - ESIC**, v. 21, p. 65–79, 2017.

LAFARGA, T.; HAYES, M. Bioactive protein hydrolysates in the functional food ingredient industry: Overcoming current challenges. **Food Reviews International**, v. 33, n. 3, p. 217–246, 2017.

LAHOGUE, V.; RÉHEL, K.; TAUPIN, L.; HARAS, D.; ALLAUME, P. A HPLC-UV method for the determination of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity. **Food Chemistry**, v. 118, n. 3, p. 870–875, 2010.

LARA, G.; HOSTINS, B.; BEZERRA, A.; POERSCH, L.; WASIELESKY, W. The effects of different feeding rates and re-feeding of *Litopenaeus vannamei* in a biofloc culture system. **Aquacultural Engineering**, v. 77, p. 20–26, 2017.

LASSOUED, I.; MORA, L.; NASRI, R.; AYDI, M.; TOLDRÁ, F.; ARISTOY, M. C.; BARKIA, A.; NASRI, M. Characterization, antioxidative and ACE inhibitory properties of hydrolysates obtained from thornback ray (*Raja clavata*) muscle. **Journal of Proteomics**, v. 128, p. 458–468, 2015.

LATORRES, J. M.; RIOS, D. G.; SAGGIOMO, G.; WASIELESKY, W.; PRENTICE-HERNANDEZ, C. Functional and antioxidant properties of protein hydrolysates obtained from white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Journal of Food Science and Technology**, v. 55, n. 2, p. 1–9, 2018.

LEE, S. Y.; HUR, S. J. Antihypertensive peptides from animal products, marine organisms, and plants. **Food Chemistry**, v. 228, p. 506–517, 2017.

LEE, Y.; PHAT, C.; HONG, S.-C. Structural diversity of marine cyclic peptides and their molecular mechanisms for anticancer, antibacterial, antifungal, and other clinical applications. **Peptides**, v. 95, n. June, p. 94–105, 2017.

LI, X. R.; CHI, C. F.; LI, L.; WANG, B. Purification and identification of antioxidant peptides from protein hydrolysate of scalloped hammerhead (*Sphyrna lewini*) cartilage. **Marine Drugs**, v. 15, n. 3, 2017.

LIASET, B.; ESPE, M. Nutritional composition of soluble and insoluble fractions obtained by enzymatic hydrolysis of fish-raw materials. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 1, p. 42–48, 2008.

LIU, W.; YE, A.; LIU, W.; LIU, C.; HAN, J.; SINGH, H. Behaviour of liposomes loaded with bovine serum albumin during in vitro digestion. **Food Chemistry**, v. 175, p. 16–24, 2015.

LIU, Y.; LI, X.; CHEN, Z.; YU, J.; WANG, F.; WANG, J. Characterization of structural and functional properties of fish protein hydrolysates from surimi processing by-products. **Food Chemistry**, v. 151, p. 459–465, 2014.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDAL., R. J. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.

LUO, F.; XING, R.; WANG, X.; YANG, H.; LI, P. Antioxidant activities of *Rapana venosa* meat and visceral mass during simulated gastrointestinal digestion and their membrane ultrafiltration fractions. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 53, n. 2, p. 395–403, 2018.

MA, S.; HUANG, D.; ZHAI, M.; YANG, L.; PENG, S.; CHEN, C.; FENG, X.; WENG, Q.; ZHANG, B.; XU, M. Isolation of a novel bio-peptide from walnut residual protein inducing

apoptosis and autophagy on cancer cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 1, p. 1–14, 2015.

MAHMOODANI, F.; GHASSEM, M.; BABJI, A. S.; YUSOP, S. M.; KHOSROKHAVAR, R. ACE inhibitory activity of pangasius catfish (*Pangasius sutchi*) skin and bone gelatin hydrolysate. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 9, p. 1847–1856, 2014.

MARTINI, N. D. N.; NURSYAM, H.; FADJAR, M. The Effects of Different Intensive Culture Systems on White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Muscle Protein Pattern. **Journal of Life Science and Biomedicine**, v. 5, n. 4, p. 97–101, 2015.

MARTINS, V. G.; COSTA, J. A. V.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Hidrolisado protéico de pescado obtido por vias química e enzimática a partir de corvina (*Micropogonias furnieri*). **Quimica Nova**, v. 32, n. 1, p. 61–66, 2009.

MENDONÇA DINIZ, F.; MARTIN, A. M. Influence of process variables on the hydrolysis of shark muscle protein. **Food Science and Technology International**, v. 4, n. 2, p. 91–98, 1998.

MIRHOSSEINI, M.; AFZALI, M. Investigation into the antibacterial behavior of suspensions of magnesium oxide nanoparticles in combination with nisin and heat against Escherichia coli and Staphylococcus aureus in milk. **Food Control**, v. 68, p. 208–215, 2016.

MOHAMED, S. Functional foods against metabolic syndrome (obesity, diabetes, hypertension and dyslipidemia) and cardiovasular disease. **Trends in Food Science and Technology**, v. 35, n. 2, p. 114–128, 2014.

MOHAN, A.; MCCLEMENTS, D. J.; UDENIGWE, C. C. Encapsulation of bioactive whey peptides in soy lecithin-derived nanoliposomes: Influence of peptide molecular weight. **Food Chemistry**, v. 213, p. 143–148, 2016.

MOHAN, A.; RAJENDRAN, S. R. C. K.; HE, Q. S.; BAZINET, L.; UDENIGWE, C. C. Encapsulation of food protein hydrolysates and peptides: a review. **RSC Adv.**, v. 5, n. 97, p. 79270–79278, 2015.

MOHAN, A.; RAJENDRAN, S. R. C. K.; THIBODEAU, J.; BAZINET, L.; UDENIGWE, C. C. Liposome encapsulation of anionic and cationic whey peptides: Influence of peptide net charge on properties of the nanovesicles. **LWT - Food Science and Technology**, v. 87, p. 40–46, 2018.

MOKNI GHRIBI, A.; MAKLOUF GAFSI, I.; 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.

MOLLA, A. E.; HOVANNISYAN, H. G. Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of beluga Huso huso using Protamex. v. 3, p. 93–99, 2011.

MORAIS, H. A.; DA SILVA BARBOSA, C. M.; DELVIVO, F. M.; MANSUR, H. S.; DE OLIVEIRA, M. C.; SILVESTRE, M. P. C. Comparative study of microencapsulation of casein hydrolysates in lipospheres and liposomes. **Journal of Food Biochemistry**, v. 28, n. 1, p. 21–41, 2004.

MORALES-MEDINA, R.; TAMM, F.; GUADIX, A. M.; GUADIX, E. M.; DRUSCH, S. Functional and antioxidant properties of hydrolysates of sardine (S. pilchardus) and horse mackerel (*T. mediterraneus*) for the microencapsulation of fish oil by spray-drying. **Food Chemistry**, v. 194, p. 1208–1216, 2016.

MORRIS, S. J. Arginine metabolism in vascular biology and disease. **Vascular Medicine**, v. 10, p. S83–S87, 2005.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytoxicity assays. **Journal Immunology Methods**, v. 65, p. 55–63, 1983.

MOSQUERA, M.; GIMÉNEZ, B.; DA SILVA, I. M.; BOELTER, J. F.; MONTERO, P.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; BRANDELLI, A. Nanoencapsulation of an active peptidic fraction from sea bream scales collagen. **Food Chemistry**, v. 156, p. 144–150, 2014.

MOSQUERA, M.; GIMÉNEZ, B.; MONTERO, P.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. Incorporation of liposomes containing squid tunic ACE-inhibitory peptides into fish gelatin. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 3, p. 769–776, 2016.

MURI, E. M. F. Proteases virais: Importantes alvos terapêuticos de compostos peptideomiméticos. **Quimica Nova**, v. 37, n. 2, p. 308–316, 2014.

NAJAFIAN, L.; BABJI, A. S. A review of fish-derived antioxidant and antimicrobial peptides: Their production, assessment, and applications. **Peptides**, v. 33, n. 1, p. 178–185, 2012.

NALINANON, S.; BENJAKUL, S.; KISHIMURA, H.; SHAHIDI, F. Functionalities and antioxidant properties of protein hydrolysates from the muscle of ornate threadfin bream treated with pepsin from skipjack tuna. **Food Chemistry**, v. 124, n. 4, p. 1354–1362, 2011.

NASRI, R.; JRIDI, M.; LASSOUED, I.; JEMIL, I.; BEN SLAMA-BEN SALEM, R.; NASRI, M.; KARRA-CHÂABOUNI, M. The influence of the extent of enzymatic hydrolysis on antioxidative properties and ACE-inhibitory activities of protein hydrolysates from goby (*Zosterisessor ophiocephalus*) muscle. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 173, n. 5, p. 1121–1134, 2014.

NATORI, M. M., SUSSEL, F. R., DOS SANTOS, E. C. B., PREVIERO, T. C., VIEGAS, E. M. M., GAMEIRO, A. H. Desenvolvimento da carcinicultura marinha no brasil e no mundo. **Informações Econômicas**, v. 41, n. 2, p. 61–73, 2011.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

NESSE, K. O.; NAGALAKSHMI, A. P.; MARIMUTHU, P.; SINGH, M.; BHETARIYA, P. J.; HO, M.; SIMON, R. R. Safety evaluation of fish protein hydrolysate supplementation in malnourished children. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 69, n. 1, p. 1–6, 2014.

NEVES, A. C.; HARNEDY, P. A.; O'KEEFFE, M. B.; FITZGERALD, R. J. Bioactive peptides from Atlantic salmon (*Salmo salar*) with angiotensin converting enzyme and dipeptidyl peptidase IV inhibitory, and antioxidant activities. **Food Chemistry**, v. 218, p. 396–405, 2017.

NGO, D. H.; RYU, B.; KIM, S. K. Active peptides from skate (*okamejei kenojei*) skin gelatin diminish angiotensin-i converting enzyme activity and intracellular free radical-mediated oxidation. **Food Chemistry**, v. 143, p. 246–255, 2014.

NGO, D.; VO, T.; RYU, B.; KIM, S. Angiotensin- I- converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from Pacific cod skin gelatin using ultrafiltration membranes. v. 51, p. 1622–1628, 2016.

NIKOO, M.; BENJAKUL, S. Potential application of seafood-derived peptides as bifunctional ingredients, antioxidant-cryoprotectant: A review. **Journal of Functional Foods**, v. 19, p. 753–764, 2015.

NILSANG, S.; LERTSIRI, S.; SUPHANTHARIKA, M.; ASSAVANIG, A. Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases. **Journal of Food Engineering**, v. 70, n. 4, p. 571–578, 2005.

NIMALARATNE, C.; BANDARA, N.; WU, J. Purification and characterization of antioxidant peptides from enzymatically hydrolyzed chicken egg white. **Food Chemistry**, v. 188, p. 467–472, 2015.

NOBILE, V.; DUCLOS, E.; MICHELOTTI, A.; BIZZARO, G.; NEGRO, M.; SOISSON, F. Supplementation with a fish protein hydrolysate (*Micromesistius poutassou*): Effects on body weight, body composition, and CCK/GLP-1 secretion. **Food and Nutrition Research**, v. 60, p. 1–9, 2016.

NOMAN, A.; XU, Y.; AL-BUKHAITI, W. Q.; ABED, S. M.; ALI, A. H.; RAMADHAN, A. H.; XIA, W. Influence of enzymatic hydrolysis conditions on the degree of hydrolysis and functional properties of protein hydrolysate obtained from Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) by using papain enzyme. **Process Biochemistry**, n. January, p. 0–1, 2018.

NWACHUKWU, I. D.; GIRGIH, A. T.; MALOMO, S. A.; ONUH, J. O.; ALUKO, R. E. Thermoase-derived flaxseed protein hydrolysates and membrane ultrafiltration peptide fractions have systolic blood pressure-lowering effects in spontaneously hypertensive rats. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 10, p. 18131–18147, 2014.

OETTERER, M.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B.; SPOTO, M. H. F. **Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 1. ed. Barueri: [s.n.], 2010.

OKAMOTO, Y.; TAGUCHI, K.; YAMASAKI, K.; SAKURAGI, M.; KURODA, S.; OTAGIRI, M. Albumin-encapsulated liposomes: A novel drug delivery carrier with hydrophobic drugs encapsulated in the inner aqueous core. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 107, n. 1, p. 436–445, 2018.

ORDÓÑEZ, J. A. **Tecnologia de Alimentos - Componentes dos Alimentos e Processos**. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

PAN, X.; ZHAO, Y. Q.; HU, F. Y.; CHI, C. F.; WANG, B. Anticancer activity of a hexapeptide from skate (*Raja porosa*) cartilage protein hydrolysate in HeLa cells. **Marine Drugs**, v. 14, n. 8, p. 1–11, 2016.

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

PARAMAN, I.; HETTIARACHCHY, N. S.; SCHAEFER, C. Glycosylation and deamidation of rice endosperm protein for improved solubility and emulsifying properties. **Cereal Chemistry**, v. 84, n. 6, p. 593–599, 2007.

PARJIKOLAEI, B. P.; BAHIJ EL-HOURI, R.; FRETTÉ, X. C.; CHRISTENSEN, K. V. Influence of green solvent extraction on carotenoid yield from shrimp (*Pandalus borealis*) processing waste. **Journal of Food Engineering**, v. 155, p. 22–28, 2015.

PEARCE, K. N.; KINSELLA, J. E. Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 26, n. 3, p. 716–723, 1978.

PICOT, L.; BORDENAVE, S.; DIDELOT, S.; FRUITIER-ARNAUDIN, I.; SANNIER, F.; THORKELSSON, G.; BERGÉ, J. P.; GUÉRARD, F.; CHABEAUD, A.; PIOT, J. M. Antiproliferative activity of fish protein hydrolysates on human breast cancer cell lines. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 5, p. 1217–1222, 2006.

PIHLANTO-LEPPÄLÄ, A. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: Opioid and ace-inhibitory peptides. **Trends in Food Science and Technology**, v. 11, n. 9–10, p. 347–356, 2000.

PIOTROWICZ, I. B. B.; MELLADO, M. M. S. Chemical, technological and nutritional quality of sausage processed with surimi. **International Food Research Journal**, v. 22, n. 5, p. 2103–2110, 2015a.

PIOTROWICZ, I. B. B.; MELLADO, M. M. S. Antioxidant hydrolysates production from Argentine anchovy (*Engraulis anchoita*) with different enzymes. **International Food Research Journal**, v. 22, n. 3, p. 1203–1211, 2015b.

POKORA, M.; ECKERT, E.; ZAMBROWICZ, A.; BOBAK, Ł.; SZOŁTYSIK, M.; DĄBROWSKA, A.; CHRZANOWSKA, J.; POLANOWSKI, A.; TRZISZKA, T. Biological and functional properties of proteolytic enzyme-modified egg protein by-products. **Food Science & Nutrition**, v. 1, n. 2, p. 184–195, 2013.

POWERS, J. P.; HANCOCK, R. E. The relationship between peptide structure and bacterial Activity. **Peptides**, v. 24, p. 1681–1691, 2003.

PUTRA, S. N. K. M.; ISHAK, N. H.; SARBON, N. M. Preparation and characterization of physicochemical properties of golden apple snail (*Pomacea canaliculata*) protein hydrolysate as affected by different proteases. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 13, n. July 2017, p. 123–128, 2018.

RADEK, K.; GALLO, R. Antimicrobial peptides: Natural effectors of the innate immune system. **Seminars in Immunopathology**, v. 29, n. 1, p. 27–43, 2007.

RAFIEE, Z.; BARZEGAR, M.; SAHARI, M. A.; MAHERANI, B. Nanoliposomal carriers for improvement the bioavailability of high – valued phenolic compounds of pistachio green hull extract. **Food Chemistry**, v. 220, p. 115–122, 2017.

RAGHAVAN, S.; KRISTINSSON, H. G. ACE-inhibitory activity of tilapia protein hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 117, n. 4, p. 582–588, 2009.

RAJABZADEH, M.; POURASHOURI, P.; SHABANPOUR, B.; ALISHAHI, A. Amino acid composition, antioxidant and functional properties of protein hydrolysates from the roe of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **International Journal of Food Science and Technology**, v. 53, p. 313–319, 2018.

RAJANBABU, V.; CHEN, J. Applications of antimicrobial peptides from fish and perspectives for the future. **Peptides**, p. 411–415, 2011.

RAJAPAKSE, N.; MENDIS, E.; JUNG, W. K.; JE, J. Y.; KIM, S. K. Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties. **Food Research International**, v. 38, n. 2, p. 175–182, 2005.

RAMEZANZADE, L.; HOSSEINI, S. F.; NIKKHAH, M. Biopolymer-coated nanoliposomes as carriers of rainbow trout skin-derived antioxidant peptides. **Food Chemistry**, v. 234, p. 220–229, 2017.

RAWLINGS, N. D.; WALLER, M.; BARRETT, A. J.; BATEMAN, A. *MEROPS* : the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. D503–D509, 2014.

RAY, S.; RAYCHAUDHURI, U.; CHAKRABORTY, R. An overview of encapsulation of active compounds used in food products by drying technology. **Food Bioscience**, v. 13, p. 76–83, 2016.

RAZALI, A. N.; AMIN, A. M.; SARBON, N. M. Antioxidant activity and functional properties of fractionated cobia skin gelatin hydrolysate at different molecular weight. **International Food Research Journal**, v. 22, n. 2, p. 651–660, 2015.

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.

ROBERT, M.; ZATYLNY-GAUDIN, C.; FOURNIER, V.; CORRE, E.; LE CORGUILLÉ, G.; BERNAY, B.; HENRY, J. Molecular characterization of peptide fractions of a Tilapia (*Oreochromis niloticus*) by-product hydrolysate and in vitro evaluation of antibacterial activity. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 3, p. 487–492, 2015.

RODRIGUES, M. H. P.; DE QUADROS, C. DA C.; CAVALHEIRO, P. L.; DE SOUZA, M. M.; PRENTICE, C. Physicochemical, microbiological, and sensory properties of pâté elaborated from whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*) muscle. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 26, n. 8, p. 903–912, 2017.

ROSENBERG, M. Current and future applications for membrane processes in the dairy industry. **Trends in Food Science and Technology**, v. 6, p. 12–19, 1995.

ROSLAN, J.; MUSTAPA KAMAL, S. M.; KHAIRUL, K. F.; ABDULLAH, N. Assessment on multilayer ultrafiltration membrane for fractionation of tilapia by-product protein hydrolysate with angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity. **Separation and Purification Technology**, v. 173, p. 250–257, 2017.

ROSLAN, J.; MUSTAPA KAMAL, S. M.; KHAIRUL, K. F.; ABDULLAH, N. Evaluation on performance of dead-end ultrafiltration membrane in fractionating tilapia by-product

protein hydrolysate. **Separation and Purification Technology**, v. 195, n. June 2017, p. 21–29, 2018.

ROTIMI E. ALUKO. Bioactive Peptides. In: **Functional Foods and Nutraceuticals**. New York: Springer, 2012. p. 37–62.

RUTHERFURD, S. M. Methodology for Determining Degree of Hydrolysis of Proteins in Hydrolysates: A Reviewo Title. **Journal of AOAC International**, v. 93, n. 5, p. 1515–1522, 2010.

RUTHERFURD, S. M.; GILANI, G. S. Amino acid analysis. **Current Protocols in Protein Science**, v. 58, p. 1–37, 2009.

RYDER, K.; BEKHIT, A. E. D.; MCCONNELL, M.; CARNE, A. Towards generation of bioactive peptides from meat industry waste proteins: Generation of peptides using commercial microbial proteases. **Food Chemistry**, v. 208, p. 42–50, 2016.

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, 2015a.

SAADI, S.; SAARI, N.; ANWAR, F.; HAMID, A. A.; GHAZALI, H. M. Recent advances in food biopeptides: Production, biological\nfunctionalities and therapeutic applications. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 1, p. 80–116, 2015b.

SAH, B. N. P.; VASILJEVIC, T.; MCKECHNIE, S.; DONKOR, O. N. Identification of anticancer peptides from bovine milk proteins and their potential roles in management of cancer: A critical review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 14, n. 2, p. 123–138, 2015.

SAIDI, S.; DERATANI, A.; BELLEVILLE, M. P.; BEN AMAR, R. Antioxidant properties of peptide fractions from tuna dark muscle protein by-product hydrolysate produced by membrane fractionation process. **Food Research International**, v. 65, n. PC, p. 329–336, 2014.

SAIGA, A.; OKUMURA, T.; MAKIHARA, T.; KATSUDA, S.-I.; MORIMATSU, F.; NISHIMURA, T. Action Mechanism of an Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptide Derived from Chicken Breast Muscle. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 3, p. 942–945, 2006.

SALAMPESSY, J.; REDDY, N.; PHILLIPS, M.; KAILASAPATHY, K. Isolation and characterization of nutraceutically potential ACE-Inhibitory peptides from leatherjacket (*Meuchenia sp.*) protein hydrolysates. **LWT - Food Science and Technology**, v. 80, p. 430–436, 2017.

SALEM, R. B. S.; BKHAIRIA, I.; ABDELHEDI, O.; NASRI, M. Octopus vulgaris protein hydrolysates : characterization , antioxidant and functional properties. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 6, p. 1442–1454, 2017.

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

SARZANI, R.; SALVI, F.; DESSI-FULGHERI, P.; RAPPELI, A. Renin – angiotensin system , natriuretic peptides , obesity , metabolic syndrome , and hypertension : an integrated view in humans. **Journal of Hypertension**, v. 26, p. 831–843, 2008.

SATHE, S. K.; SALUNKHE, D. K. Functional Properties of the Great Northern Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Proteins: Emulsion, Foaming, Viscosity, and Gelation Properties. **Journal of Food Science**, v. 46, n. 1, p. 71–81, 1981.

SBROGGIO, M. F.; MONTILHA, M. S.; FIGUEIREDO, V. R. G. DE; GEORGETTI, S. R.; KUROZAWA, L. E. Influence of The Degree of Hydrolysis and Type of Enzyme on Antioxidant Activity of Okara Protein Hydrolysates. **Food Science and Technology**, v. 36, n. 2, p. 375–381, 2016.

SEDAGHATI, M.; EZZATPANAH, H.; BOOJAR, M. M. A.; EBRAHIMI, M. T.; AMINAFSHAR, M. Plasmin-digest of β-lactoglobulin with antibacterial properties. **Food and Agricultural Immunology**, v. 8, p. 218–230, 2015.

SEDAGHATI, M.; EZZATPANAH, H.; BOOJAR, M. M. A.; TAJABADI, M. Plasmin digest of κ-casein as a source of antibacterial peptides. **Journal of Dairy Research**, v. 8, p. 245–251, 2014.

SEDAGHATI, M.; EZZATPANAH, H.; MASHHADI AKBAR BOOJAR, M.; TAJABADI EBRAHIMI, M.; KOBARFARD, F. Isolation and identification of some antibacterial peptides in the plasmin-digest of β-casein. **LWT - Food Science and Technology**, v. 68, p. 217–225, 2016.

SERRA, I.; SCORCIAPINO, M. A.; MANZO, G.; CASU, M.; RINALDI, A. C.; ATTOUB, S.; MECHKARSKA, M.; CONLON, J. M. Conformational analysis and cytotoxic activities of the frog skin host-defense peptide, hymenochirin-1Pa. **Peptides**, v. 61, p. 114–121, 2014.

SHAHIDI, F. **Antioxidants: Principles and applications**. [s.l.] Elsevier Ltda, 2015.

SHAI, Y. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides,. **Biopolymers**, v. 66, p. 236–248, 2002.

SHAVANDI, A.; HU, Z.; TEH, S. S.; ZHAO, J.; CARNE, A.; BEKHIT, A.; BEKHIT, A. E. D. A. Antioxidant and functional properties of protein hydrolysates obtained from squid pen chitosan extraction effluent. **Food Chemistry**, v. 227, p. 194–201, 2017.

SHAZLY, A. B.; HE, Z.; EL-AZIZ, M. A.; ZENG, M.; ZHANG, S.; QIN, F.; CHEN, J. Fractionation and identification of novel antioxidant peptides from buffalo and bovine casein hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 232, p. 753–762, 2017.

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

SILA, A.; HEDHILI, K.; PRZYBYLSKI, R.; ELLOUZ-CHAABOUNI, S.; DHULSTER, P.; BOUGATEF, A.; NEDJAR-ARROUME, N. Antibacterial activity of new peptides from barbel protein hydrolysates and mode of action via a membrane damage mechanism against Listeria monocytogenes. **Journal of Functional Foods**, v. 11, n. C, p. 322–329, 2014a.

SILA, A.; MARTINEZ-ALVAREZ, O.; HADDAR, A.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; NASRI, M.; MONTERO, M. P.; BOUGATEF, A. Recovery, viscoelastic and functional properties of Barbel skin gelatine: Investigation of anti-DPP-IV and anti-prolyl endopeptidase activities of generated gelatine polypeptides. **Food Chemistry**, v. 168, p. 478–486, 2015.

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, 2014b.

SILVA, C. M.; FONSECA, R. A. DOS S. DA; PRENTICE, C. Comparing the Hydrolysis Degree of Industrialization By Products od Withemouth Croaker (*Micropogonias furnieri*) Using Microbial Enzymes. **International Food Research Journal**, v. 21, n. 5, p. 1757–1761, 2014.

SIMPSON, B. K.; NAYERI, G.; YAYLAYAN, V.; ASHIE, I. N. A. Enzymatic Hydrolysis of Shrimp Meat. **Food Chemistry**, v. 61, n. 1, p. 131–138, 1998.

SJAIFULLAH, A.; SANTOSO, A. B. Autolytic isolation of chitin from white shrimp (*Penaues Vannamei*) Waste. **Procedia Chemistry**, v. 18, p. 49–52, 2016.

SLIZYTE, R.; ROMMI, K.; MOZURAITYTE, R.; ECK, P.; FIVE, K.; RUSTAD, T. Bioactivities of fish protein hydrolysates from defatted salmon backbones. **Biotechnology Reports**, v. 11, p. 99–109, 2016.

SONG, R.; WEI, R. BIAN; RUAN, G. QIANG; LUO, H. YU. Isolation and identification of antioxidative peptides from peptic hydrolysates of half-fin anchovy (*Setipinna taty*). **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, n. 1, p. 221–229, 2015.

SOUISSI, N.; BOUGATEF, A.; TRIKI-ELLOUZ, Y.; NASRI, M. Biochemical and functional properties of sardinella (*Sardinella aurita*) by-product hydrolysates. **Food Technol. Biotecnol.**, v. 45, n. 2, p. 187–194, 2007.

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.

SRIKET, P.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; KIJROONGROJANA, K. Comparative studies on chemical composition and thermal properties of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) and white shrimp (*Penaeus vannamei*) meats. **Food Chemistry**, v. 103, n. 4, p. 1199–1207, 2007.

SRINIVASAN, H.; KANAYAIRAM, V.; RAVICHANDRAN, R. Chitin and chitosan preparation from shrimp shells Penaeus monodon and its human ovarian cancer cell line, PA-1. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, p. 662–667, 2017.

SUMANTHA, A.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Microbiology and industrial biotechnology of food–grade proteases: A perspective. **Food Technology and Biotechnolog**, v. 44, n. 2, p. 211–220, 2006.

SUWAL, S.; KETNAWA, S.; LICEAGA, A. M.; HUANG, J. Y. Electro-membrane

fractionation of antioxidant peptides from protein hydrolysates of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) byproducts. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 45, n. July 2017, p. 122–131, 2018.

SUWAL, S.; ROBLET, C.; AMIOT, J.; DOYEN, A.; BEAULIEU, L.; LEGAULT, J.; BAZINET, L. Recovery of valuable peptides from marine protein hydrolysate by electrodialysis with ultrafiltration membrane: impact of ionic strength. **Food Research International**, v. 65, n. PC, p. 407–415, 2014.

TAHERI, A.; ANVAR, S. A. A.; AHARI, H.; FOGLIANO, V. Comparison the functional properties of protein Hydrolysates from poultry byproducts and rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) viscera. **Iranian Journal of Fisheries Sciences**, v. 12, n. 1, p. 154–169, 2013a.

TANASKOVIĆ, S. J.; LUKOVIĆ, N.; GRBAVČIĆ, S.; STEFANOVIĆ, A.; JOVANOVIĆ, J.; BUGARSKI, B.; KNEŽEVIĆ-JUGOVIĆ, Z. Production of egg white protein hydrolysates with improved antioxidant capacity in a continuous enzymatic membrane reactor: optimization of operating parameters by statistical design. **Journal of Food Science and Technology**, v. 55, p. 128–137, 2018.

TANG, W.; ZHANG, H.; WANG, L.; QIAN, H.; QI, X. Targeted separation of antibacterial peptide from protein hydrolysate of anchovy cooking wastewater by equilibrium dialysis. **Food Chemistry**, v. 168, p. 115–123, 2015.

TAVARES, T. G.; AMORIM, M.; GOMES, D.; PINTADO, M. E.; PEREIRA, C. D.; MALCATA, F. X. Manufacture of bioactive peptide-rich concentrates from Whey: Characterization of pilot process. **Journal of Food Engineering**, v. 110, p. 547–552, 2012.

TEIXEIRA, M. L.; DOS SANTOS, J.; SILVEIRA, N. P.; BRANDELLI, A. Phospholipid nanovesicles containing a bacteriocin-like substance for control of Listeria monocytogenes. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 9, n. 1, p. 49–53, 2008.

TOLDRÁ, F.; REIG, M.; ARISTOY, M. C.; MORA, L. Generation of bioactive peptides during food processing. **Food Chemistry**. Doi: 10.1016/j.foodchem.2017.06.119, 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.

TRINDADE, G. S.; CAPELLA, M. A. M.; CAPELLA, L. S.; AFFONSO-MITIDIER, O. R. RUMJANEK, V. M. Differences in sensitivity to UVC, UVB and UVA radiation of a multidrug-resistant cell line overexpressing P-glycoprotein. **Photochemistry Photobiology**, v. 69, p. 694–699, 1999.

UDENIGWE, C. C. Bioinformatics approaches, prospects and challenges of food bioactive peptide research. **Trends in Food Science and Technology**, v. 36, n. 2, p. 137–143, 2014.

UDENIGWE, C. C.; ALUKO, R. E. Food protein-derived bioactive peptides: Production, processing, and potential health benefits. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 1, 2012.

UMAYAPARVATHI, S.; MEENAKSHI, S.; VIMALRAJ, V.; ARUMUGAM, M.; SIVAGAMI, G.; BALASUBRAMANIAN, T. Antioxidant activity and anticancer effect of

bioactive peptide from enzymatic hydrolysate of oyster (*Saccostrea cucullata*). **Biomedicine and Preventive Nutrition**, v. 4, n. 3, p. 343–353, 2014.

VENUSTE, M.; ZHANG, X.; SHOEMAKER, C. F.; KARANGWA, E.; ABBAS, S.; KAMDEM, P. E. Influence of enzymatic hydrolysis and enzyme type on the nutritional and antioxidant properties of pumpkin meal hydrolysates. **Food & Function**, v. 4, n. 5, p. 811, 2013.

VERMEIRSSEN, V.; VAN CAMP, J.; VERSTRAETE, W. Optimisation and validation of an angiotensin-converting enzyme inhibition assay for the screening of bioactive peptides. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 51, n. 1, p. 75–87, 2002.

VILANI, F. G.; SCHVEITZER, R.; DA FONSECA ARANTES, R.; DO NASCIMENTO VIEIRA, F.; MANOEL DO ESPÍRITO SANTO, C.; QUADROS SEIFFERT, W. Strategies for water preparation in a biofloc system: Effects of carbon source and fertilization dose on water quality and shrimp performance. **Aquacultural Engineering**, v. 74, p. 70–75, 2016.

VILLAMIL, O.; VÁQUIRO, H.; SOLANILLA, J. F. Fish viscera protein hydrolysates: Production, potential applications and functional and bioactive properties. **Food Chemistry**, v. 224, p. 160–171, 2017.

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, K. RONG; ZHANG, B. ZHI; ZHANG, W.; YAN, J. XI; LI, J.; WANG, R. Antitumor effects, cell selectivity and structure-activity relationship of a novel antimicrobial peptide polybia-MPI. **Peptides**, v. 29, n. 6, p. 963–968, 2008.

WANG, N.; WANG, W.; LIU, X.; LIU, C.; JIANCANG, J.; LU, Y. Purification and Characterization of Antiproliferative Peptide from Enzymatic Hydrolysates of Chinese Soft-Shelled Turtle Protein. **International Journal of Agriculture & Biology,** v. 20, p. 209–214, 2018.

WATFORD, M. Glutamine and glutamate: Nonessential or essential amino acids? **Animal Nutrition**, v. 1, n. 3, p. 119–122, 2015.

WEN, P.; ZONG, M. H.; LINHARDT, R. J.; FENG, K.; WU, H. Electrospinning: A novel nano-encapsulation approach for bioactive compounds. **Trends in Food Science and Technology**, v. 70, n. October, p. 56–68, 2017.

WHITE, J. A.; FRY, J. C.; HART, R. J. An evaluation of the waters pico tag system for the amino acid analysis of food materials. **Journal of Automatic Chemistry**, v. 8, n. 4, p. 170–177, 1986.

WHO. **World Health Organization**. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>. Acesso em: 4 fev. 2018.

WHO/FAO/UNU EXPERT CONSULTATION. Protein and amino acid requirements in human nutrition. **World Health Organization technical report series**, n. 935, p. 1–265, 2007.

WITONO, Y.; TARUNA, I.; WINDRATI, W. S.; AZKIYAH, L.; SARI, T. N. “Wader” (*Rasbora jacobsoni*) Protein hydrolysates: Production, Biochemical, and Functional Properties. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**, v. 9, p. 482–492, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WORLD HEALTH STATISTICS - MONITORING HEALTH FOR THE SDGs. **World Health Organization**, p. 1.121, 2016.

WU, J. Improved method for direct high-performance liquid chromatography assay of angiotensin-converting enzyme-catalyzed reactions. **Journal of Chromatography A**, v. 15, n. 950, p. 125–130, 2002.

WU, J.; LIAO, W.; UDENIGWE, C. C. Revisiting the mechanisms of ACE inhibitory peptides from food proteins. **Trends in Food Science and Technology**, v. 69, p. 214–219, 2017.

WU, L.; JIANG, A.; JING, Y.; ZHENG, Y.; YAN, Y. Antioxidant properties of protein hydrolysate from Douchi by membrane ultrafiltration. **International Journal of Food Properties**, v. 20, n. 5, p. 997–1006, 2017.

XIE, Z.; HUANG, J.; XU, X.; JIN, Z. Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate. **Food Chemistry**, v. 111, n. 2, p. 370–376, 2008.

XU, X.; LIU, W.; LIU, C.; LUO, L.; CHEN, J.; LUO, S.; MCCLEMENTS, D. J.; WU, L. Effect of limited enzymatic hydrolysis on structure and emulsifying properties of rice glutelin. **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 251–260, 2016.

YANG, Z. C.; YANG, L.; ZHANG, Y. X.; YU, H. F.; AN, W. Effect of heat and pH denaturation on the structure and conformation of recombinant human hepatic stimulator substance. **Protein Journal**, v. 26, n. 5, p. 303–313, 2007.

YOKOTA, D.; MORAES, M.; PINHO, S. C. Characterization of lyophilized liposomes produced with non-purified soy lecithin: A case study of casein hydrolysate microencapsulation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 29, n. 2, p. 325–335, 2012.

YU, W.; FIELD, C. J.; WU, J. Purification and Identification of Anti-inflammatory Peptides from Spent Hen Muscle Proteins Hydrolysate. **Food Chemistry**, n. 253, p. 101-107, 2018.

ZAMORA-SILLERO, J.; RAMOS, P.; MONSERRAT, J. M.; PRENTICE, C. Evaluation of the Antioxidant Activity *In Vitro* and in Hippocampal HT-22 Cells System of Protein Hydrolysates of Common Carp (*Cyprinus carpio*) By-Product. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 27, n. 1, p. 21–34, 2018.

ZARDINI, A. A.; MOHEBBI, M.; FARHOOSH, R.; BOLURIAN, S. Production and characterization of nanostructured lipid carriers and solid lipid nanoparticles containing lycopene for food fortification. **Journal of Food Science and Technology**, v. 55, n. 1, p. 1–12, 2018.

ZAVAREZE, E. R; SILVA, C. M.; SALAS-MELLADO, M.; PRENTICE-HERNANDEZ, C. Funcionalidade de hidrolisados proteicos de cabrinha (*Prionotus Punctatus*) obtidos a partir de diferentes proteases microbianas. *Quimica Nova*, v. 32, n. 7, p. 1739–1743, 2009.

ZAVAREZE, E. R.; TELLES, A. C.; MELLO EL HALAL, S. L.; DA ROCHA, M.; COLUSSI, R.; MARQUES DE ASSIS, L.; SUITA DE CASTRO, L. A.; GUERRA DIAS, A. R.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Production and characterization of encapsulated antioxidative protein hydrolysates from Whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*) muscle and byproduct. **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, n. 2P1, p. 841–848, 2014.

ZHANG, J.; ZHANG, H.; WANG, L.; GUO, X.; WANG, X.; YAO, H. Isolation and identification of antioxidative peptides from rice endosperm protein enzymatic hydrolysate by consecutive chromatography and MALDI-TOF/TOF MS/MS. **Food Chemistry**, v. 119, n. 1, p. 226–234, 2010.

ZHANG, S. B.; WANG, Z.; XU, S. Y. Antioxidant and antithrombotic activities of rapeseed peptides. **JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 85, n. 6, p. 521–527, 2008.

ZHENG, L.; ZHAO, M.; XIAO, C.; ZHAO, Q.; SU, G. Practical problems when using ABTS assay to assess the radical-scavenging activity of peptides: Importance of controlling reaction pH and time. **Food Chemistry**, v. 192, p. 288–294, 2016.

ZHENG, X. Q.; WANG, J. T.; LIU, X. L.; SUN, Y.; ZHENG, Y. J.; WANG, X. J.; LIU, Y. Effect of hydrolysis time on the physicochemical and functional properties of corn glutelin by Protamex hydrolysis. **Food Chemistry**, v. 172, p. 407–415, 2015.

ZHU, L.; JIE, C.; TANG, X.; XIONG, Y. L. Reducing, radical scavenging, and chelation properties of in vitro digests of alcalase-treated zein hydrolysate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 8, p. 2714–2721, 2008.

ZHU, Z.; YUAN, F.; XU, Z.; WANG, W.; DI, X.; BARBA, F. J.; SHEN, W.; KOUBAA, M. Stirring-assisted dead-end ultrafiltration for protein and polyphenol recovery from purple sweet potato juices: Filtration behavior investigation and HPLC-DAD-ESI-MS2profiling. **Separation and Purification Technology**, v. 169, p. 25–32, 2016.

ZOGHI, A.; KHOSRAVI-DARANI, K.; OMRI, A. Process Variables and Design of Experiments in Liposome and Nanoliposome Research. **Medicinal Chemistry**, p. 1–16, 2016.