

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Harriman Aley Morais

**PROTEÍNAS HIDROLISADAS DE SORO DE LEITE COM PROPRIEDADES
BIOATIVAS ASSOCIADAS À REDUÇÃO DE FATORES DE RISCO DE DOENÇAS
NA INFÂNCIA**

Belo Horizonte
2013

Harriman Aley Morais

**PROTEÍNAS HIDROLISADAS DE SORO DE LEITE COM PROPRIEDADES
BIOATIVAS ASSOCIADAS À REDUÇÃO DE FATORES DE RISCO DE DOENÇAS
NA INFÂNCIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Marialice Pinto Coelho Silvestre

Belo Horizonte
2013

Morais, Harriman Aley.
M827p Proteínas hidrolisadas de soro de leite com propriedades bioativas associadas à redução de fatores de risco de doença na infância [manuscrito]. / Harriman Aley Moraes. -- Belo Horizonte: 2013. 282f.: il.
Orientador (a): Marialice Pinto Coelho Silvestre.
Área de concentração: Ciências da Saúde.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Soro de Leite. 2. Hidrolisados de Proteína. 3. Peptídeos. 4. Hidrólise. 5. Antioxidantes. 6. Dissertações Acadêmicas. I. Silvestre, Marialice Pinto Coelho. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. III. Título

NLM: WB 428

*A meu pai Edu Morais e a minha mãe Maria Zélia de Morais,
que me deram a vida, me ensinaram a vivê-la com dignidade,
acreditando que tudo é possível, desde que sejamos honestos e
íntegros de caráter.*

AGRADECIMENTOS

É com muita satisfação que expresso aqui o mais profundo agradecimento a todos aqueles que tornaram possível a realização deste trabalho. Contudo, uma tese de doutoramento é uma longa jornada, e foram tantas pessoas que contribuíram com minha formação, que tenho medo de esquecer alguém. Mas de antemão espero que me perdoem caso isso aconteça!

Inicio meus agradecimentos por meus pais *Seu Dudu e Dona Zélia*, que além de me oferecerem a oportunidade de estudar, sempre estiveram presentes em minha vida. Lamento todos os momentos em que perdi a oportunidade de dizer que amo vocês!!

Não posso esquecer-me de meus irmãos (Romero, Harrison, Eduarley e Romarley) e minhas irmãs (Romênia, Lorrane, Flaviane e Christiane) e dos “agregados” Simone, José Maria, Ricardo e Octávio. O que dizer então de meus sobrinhos Luciana, Rafael, Cecília, Sofia, Arthur, Henrique, Alice e a pequena Luíza. E minha madrinha Tia Míriam. Pessoas tão importantes, que só tenho uma coisa a dizer: nós somos uma família!!

Meu carinho especial ao Vagner Campos de Araújo, companheiro de longa data, que acompanhou toda a trajetória deste doutoramento, respeitando-me, incentivando-me e simplesmente ficando ao meu lado. Sou grato por cada gesto carinhoso, por cada sorriso direcionado a mim!

Muito obrigado à Dona Elza Campos de Araújo, que me acolheu em vários momentos difíceis, que não foram raros no último ano desta longa jornada!

Tenho que agradecer a professora Marialice Pinto Coelho Silvestre, que desde 1998, ainda como bolsista de aperfeiçoamento, sempre acreditou em meu potencial. Muito obrigado por ter aceitado me orientar, pela confiança que você depositou em mim.

Minha eterna gratidão à professora Josianne Nicácio Silveira, que abriu as portas do laboratório de Toxicologia da Faculdade de Farmácia/UFMG, para que eu pudesse realizar a maior parte do trabalho deste estudo. Seu espírito iluminado sempre me acalmava diante das várias dificuldades que surgiram ao longo desta jornada.

Este trabalho também não estaria finalizado sem a imensurável ajuda de dois espíritos de luz que adentraram em minha vida: Mauro Ramalho Silva e Viviane Dias Medeiros Silva. O que passamos, o que confidenciamos, o que vivemos foram experiências que ninguém compreenderá! Nenhuma palavra será boa o suficiente para expressar o que vocês representam para mim! Muito obrigado!

Ao Wendel Afonso de Oliveira, Carlos de Oliveira Lopes Júnior e Mariana Wanessa de Souza, que me apoiaram durante a realização deste trabalho. Tenho certeza que a partir de agora, um novo ciclo de colaborações se iniciará!

O que dizer então dos bolsistas de iniciação científica, Paula Parizzi (UFMG) e Juarez Henrique Teixeira Gonçalves (UFVJM), cuja dedicação à execução de várias análises foi essencial para conclusão desta pesquisa. Espero que de alguma forma, eu também tenha contribuído para a formação de vocês!

Aos amigos Alexandre Soares dos Santos e Lílian Pantoja, que me acolheram tão bem quando do meu retorno à UFVJM, e que acompanharam a trajetória final deste trabalho. Muito obrigado pela paciência!

Ao meu grande amigo Herton Helder Rocha Pires, o *Tim*, cujo apoio, desde o momento em que iniciei meus trabalhos na UFMG até o término desta jornada na UFVJM, foi imensurável. É até difícil dizer como sua amizade é importante para mim! Agradeço-lhe sinceramente a oportunidade de poder conviver com você!

A todos que, de alguma forma, contribuíram para esta construção.

Sábio é o ser humano que tem coragem de ir diante do espelho da sua alma para reconhecer seus erros e fracassos e utilizá-los para plantar as mais belas sementes nos terrenos de sua inteligência. (Cury 2002, p. 29).

O mundo não é. O mundo está sendo. Como subjetividade curiosa, inteligente, interferidora na subjetividade com que dialeticamente me relaciono, meu papel no mundo não é só o de quem constata o que ocorre, mas também o de quem intervém como sujeito de ocorrências. Não sou apenas objeto da História, mas seu sujeito igualmente. No mundo da História, da cultura, da política, constato não para me adaptar, mas para mudar. (Freire 1996, p. 76-77).

RESUMO

Dentre as doenças crônicas não transmissíveis, a obesidade cresce de forma epidêmica em todo o mundo, atingindo todas as faixas etárias e, comumente, está associada à hipertensão arterial sistêmica e ao estresse oxidativo. O tratamento da obesidade engloba mudanças no estilo de vida e nos hábitos alimentares e, neste caso, oferecer produtos alimentícios atraentes para o público infanto-juvenil é um desafio. Neste trabalho, foram empregadas a pancreatina e as proteases de *Bacillus licheniformis*, de *Aspergillus oryzae* e de *Aspergillus sojae*, na obtenção de proteínas hidrolisadas do soro de leite com elevado teor de oligopeptídeos e com propriedades anti-hipertensiva e antioxidante, que poderiam ser usadas no desenvolvimento de fórmulas infantis para o tratamento da obesidade. A caracterização destes hidrolisados proteicos foi baseada na determinação do grau de hidrólise (GH), por diferentes metodologias (teor de proteína solúvel; titulação com formol; derivatização com orto-ftalaldeído – OPA; osmometria), e na análise do perfil peptídico por cromatografia líquida de alta performance de exclusão molecular, seguida da quantificação dos peptídeos e aminoácidos livres pelo método rápido da Área Corrigida da Fração. Além disso, estabeleceu-se a correlação entre estes parâmetros (grau de hidrólise x perfil peptídico), bem como a avaliação *in vitro* das propriedades anti-hipertensiva e antioxidante dos hidrolisados. Nas condições hidrolíticas estudadas, verificou-se que o emprego da protease de *Bacillus licheniformis* (E:S de 8:100) e da pancreatina (E:S de 2:100, 3:100, 4:100 e 8:100) permitiu a obtenção dos hidrolisados com as maiores somas dos teores de di- e tripeptídeos e de aminoácidos livres (9,99% e 11,28%, em média, respectivamente) e com os menores teores de grandes peptídeos (44,61% e 44,13%, em média, respectivamente). Com relação ao GH, os maiores valores foram obtidos para a pancreatina (36,41%) e para as proteases de *Bacillus licheniformis* (44,70%) e de *Aspergillus oryzae* (32,79%), determinados pelo método do teor de proteína solúvel, enquanto que para a protease de *Aspergillus sojae* este resultado foi observado com o método da derivatização com OPA (20,17%). Em vários casos, detectou-se a correlação positiva de forte intensidade ($r > 0,7$) e significativa ($p < 0,05$), entre os métodos de determinação do GH, cuja intensidade da relação variou em função do método e do tipo de enzima empregados. Além disso, em vários casos, verificou-se que os resultados do GH correlacionaram-se significativamente e de forma positiva com os teores de di- e tripeptídeos, e de forma negativa com o teor de grandes peptídeos. Neste estudo, vinte e quatro hidrolisados foram preparados e suas atividades inibitórias (AI) da enzima conversora de angiotensina (ECA) foram avaliadas *in vitro*, resultando em taxas de inibição variando de 2,02 a 96,66%, sendo que onze

apresentaram AI considerada muito alta (> 80%). Os hidrolisados obtidos pela ação da protease de *Bacillus licheniformis* apresentaram os maiores valores de AI (média de 85,96%) quando comparados com o emprego de outras enzimas, em todas as relações enzima:substrato testadas. A hidrólise enzimática das proteínas do soro de leite também levou a grande variabilidade dos resultados obtidos para a atividade antioxidante (3,79% a 90,76%). Os hidrolisados obtidos pela ação da protease de *Aspergillus sojae* apresentaram os maiores valores de atividade antioxidante, pelos métodos do DPPH (59,70%) e da desoxirribose (58,77%), na maioria das relações E:S estudadas. Para o método do pirogalol, os maiores valores (48,70 a 90,76%) foram encontrados quando a hidrólise foi promovida pela ação da protease de *Bacillus licheniformis*, em todas as relações E:S. Assim, pode-se concluir que na presente pesquisa foi possível otimizar as condições hidrolíticas para a obtenção de hidrolisados de concentrado proteico de soro de leite, com elevado valor nutricional e com propriedades anti-hipertensivas e antioxidantes.

Palavras-chave: Soro de leite. Proteínas hidrolisadas. Perfil peptídico. Grau de hidrólise. Atividade antioxidante. Atividade anti-hipertensiva.

ABSTRACT

Among the chronic diseases, the obesity has reached global epidemic proportions affecting all age groups and has been associated with hypertension and oxidative stress. The treatment of obesity involves changes in lifestyle and healthy eating habits and providing an attractive and healthful food to infant diet remains a challenge. In this study, a pancreatin and the proteases from *Bacillus licheniformis*, *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus sojae* were employed to obtain hydrolyzed whey proteins with high oligopeptide content as well as with anti-hypertensive and antioxidant activities, which could be used in the development of infant formulas for the obesity treatment. The protein hydrolysates were characterized in relation to the degree of hydrolysis (DH) by different methods (soluble protein content; formol titration; orthophthalaldehyde and osmometry), and their peptide profile was analyzed by using the high performance size-exclusion liquid chromatography for the fractionation step followed by the Rapid Correct Fraction Area method for quantifying the peptides and free amino acids. The correlation between these parameters (degree of hydrolysis and peptide profile) was established. Also, the inhibitory activity against the angiotensin-converting enzyme (ACE-IA) and the antioxidant activity of the hydrolysates were *in vitro* evaluated. The use of the *Bacillus licheniformis* protease (E:S 8:100) and pancreatin (E:S 2:100, 3:100, 4:100 and 8:100) yielded hydrolysates with the highest sums of di- and tripeptide and free amino acid contents (9.99 and 11.28%, respectively) as well as the lowest amount of large peptides (44.61 and 44.13%, respectively). Regarding the DH, the highest results were produced by the soluble protein content method for the pancreatin (36.41%), the *Bacillus licheniformis* (44.70%) and *Aspergillus oryzae* proteases (32.79%), whereas for the *Aspergillus sojae* protease this result was obtained with the orthophthalaldehyde method (20.17%). In several cases, a positive and significant correlation ($p < 0.05$) of strong intensity ($r > 0.7$) was observed among the DH determining methods and the intensity changed in function of either the determining method or the enzyme type. Additionally, in many cases the DH results were significant and positively correlated with di- and tripeptide contents and negatively correlated with the large peptide content. In this study, twenty four WPC hydrolysates were prepared and their ACE-IA was *in vitro* evaluated giving rise to results ranging from 2.02 to 96.66%, with eleven samples exhibiting very high ACE-IA ($> 80\%$). The hydrolysates obtained with the *Bacillus licheniformis* protease exhibited the greatest ACE-IA results (average of 85.96%) when compared to the other enzymes at all E:S ratios. The enzymatic hydrolysis of whey proteins also led to a great variability of the *results obtained* for the *antioxidant activity*

(3.79% to 90.76%). The action of the *Aspergillus sojae* protease produced hydrolysates with the highest values of *antioxidant activity by the DPPH* (59.70%) and deoxyribose (58.77%) methods at most of E:S ratios. For the pyrogallol method, the highest results (48.70 to 90.76%) were found when the hydrolysis was conducted by the action of the *Bacillus licheniformis* protease at all E:S ratios. It can be inferred that it was possible to optimize the hydrolytic conditions to obtain whey protein concentrate hydrolysates with high nutritional value and antihypertensive and antioxidants properties.

Keywords: Whey. Hydrolyzed proteins. Peptide profile. Degree of hydrolysis. Antioxidant activity. Anti-hypertensive activity.

LISTA DE SIGLAS

α -LA	α -lactalbumina
β -LG	β -lactoglobulina
2-ME	2-mercaptoetanol
AA	Aminoácidos
AAA	Aminoácidos aromáticos
AACR	Aminoácidos de cadeia ramificada
AAS	Aminoácidos sulfurados
ADP	Adenosina difosfato
AGPI	Ácidos graxos poli-insaturados
AH	Ácido hipúrico
AIDS	<i>Acquired immunodeficiency syndrome</i> (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)
Ala	Alanina
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
Asn	Asparagina
Asp	Aspartato
ATP	Adenosina trifosfato
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i> (ácido bicinconínico)
BHA	Butil-hidroxianisol
BHT	Butil-hidroxitolueno
CAT	Catalase
CEM	Cromatografia de exclusão molecular
CeRAC	<i>Ceric ion reducing antioxidant capacity</i> (capacidade antioxidante redutora de ions cério)
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CPP	<i>Cell-penetrating peptides</i>
CRAC	<i>Ceric reducing antioxidant capacity</i> (capacidade antioxidante redutora de cério)
CUPRAC	<i>Cupric reducing antioxidant capacity</i> ou <i>copper reduction assay</i> (capacidade antioxidante redutora de cobre ou ensaio redutor de cobre)
Cys	<i>Cystein</i> (cisteína)
Da	<i>Daltons</i>
DBO	<i>Demanda bioquímica de oxigênio</i>
DCNT	<i>Doenças crônicas não-transmissíveis</i>
DCV	<i>Doenças cardiovasculares</i>
DLMW	<i>DeminerIALIZED delactosed whey</i> (soro de leite desmineralizado e sem lactose)
DMA	<i>N, N-dimetil-2-mercaptoetil amônio</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
DPPH	<i>2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl</i> (2,2-difenil-1-picrila-hidrazila)
DQO	<i>Demanda química de oxigênio</i>
DSW	<i>Dry sweet whey</i> (soro de leite doce desidratado)
EC	<i>Enzyme Commission</i>
ECA	<i>Enzima conversora de angiotensina</i>
EDTA	<i>Ethylene amino tetracetic acid</i> (ácido etilenoaminotetracético)
ENDEF	<i>Estudo Nacional de Despesas Familiares</i>

ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FAP	Furanacrilóil-fenilalanina
FAPGG	Furanacrilóil-fenilalanilglicilglicina
FeCl ₃	Cloreto férrico
FPLC	<i>Fast protein liquid chromatography</i> (cromatografia líquida rápida de proteínas)
FRAP	<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i> (poder antioxidante redutor do ferro)
g	Grama
g/L	Gramas/litro
GG	Glicilglicina
GH	Grau de hidrólise
Gln	Glutamina
Glu	Glutamato
GMP	Glicomacropéptido
GPx	Glutathiona peroxidase
GSH	Glutathiona na forma reduzida
GST	Glutathiona S-transferase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HAT	<i>Hydrogen atom transfer</i> (transferência de átomos de hidrogênio)
HDL	<i>High density lipoprotein</i> (lipoproteína de alta densidade)
Hg	Mercúrio
HHL	Hipuril-histidil-leucina
HILIC	<i>Hydrophilic interaction chromatography</i> (cromatografia de interação hidrofílica)
His	Histidina
HIV	Human immunodeficiency vírus (vírus da imunodeficiência humana)
HNO ₂	Ácido nitroso
HO•	Radical hidroxila
HOCl	Ácido hipocloroso
Ig	Imunoglobulina
IGF	Insulin-like growth fator (fator de crescimento semelhante à insulina)
Ile	Isoleucina
IPP	Isoleucil-prolilprolina
kDa	Quilodaltons
kg	Quilograma
LDL	Low density lipoprotein (lipoproteína de baixa densidade)
Leu	Leucina
LF	Lactoferrina
LPSEC	<i>Low pressure size exclusion chromatography</i> (cromatografia de exclusão molecular de baixa pressão)
Lys	Lysin (lisina)
MDA	Malonaldialdeído
Met	Metionina
MF	Microfiltração
mg	Miligrama
mg/g	Miligrama/grama
mL	Mililitros

MM	Massa molecular
mm	Milímetro
N ₂ O ₃	Óxido nitroso
NAC	N-acetil-L-cisteína
NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate - reduced</i> (nicotinamida adenina dinucleotídeo fostato - forma reduzida)
NBB	<i>Neutral brush border</i>
NC-IUBMB	<i>Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology</i>
NF	Nanofiltração
NK	<i>Natural killers cells</i> (células exterminadoras naturais)
nL	Nanolitros
nm	Nanômetros
NO•	Radical monóxido de nitrogênio
NO ₂ ⁻	Nitritos
NO ₂ •	Radical dióxido de nitrogênio
NO ₂ Cl	Cloreto de nitrila
NO ₃ ⁻	Nitratos
O ₂	Oxigênio
O ₂ •-	Radical superóxido
O ₃	Ozônio
°C	Graus Celsius
ONOO-	Peroxinitritos
OPA	o-phthalaldehyde (ortoftalaldeído)
OR	Osmose reversa
ORAC	Oxygen radical absorbance capacity (capacidade de absorção do radical oxigênio)
p/v	Peso/volume
PA	Pressão arterial
PepT1	Transportador de peptídeos 1
PepT2	Transportador de peptídeos 2
pH	Potencial hidrogeniônico
Phe	Phenylalanine (fenilalanina)
pK	- log (k) ou constante de equilíbrio
PM	Peso molecular
POF	Pesquisa de Orçamentos Familiares
Pro	Prolina
RL	Radicais livres
RNA	Ribonucleic acid (ácido ribonucleico)
RO•	Radical alcóxila
ROO•	Radical peróxila
ROOH	Hidroperóxidos
RP-HPLC (CLAE-FR)	Reversed phase high performance liquid chromatography (cromatografia líquida de alta performance de fase reversa)
RS•	Radical tiíla
SAB	Soroalbumina bovina
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (eletroforese em gel de poliácridamida com dodecil sulfato de sódio)

SE-HPLC (CLAE-EM)	Size exclusion high performance liquid chromatography (Cromatografia líquida de alta performance de exclusão molecular)
Ser	Serina
SET	<i>Single electron transfer</i> (transferência simples de elétrons)
SH	Grupos sulfidrila
SHR	<i>Spontaneously hypertensive rats</i> (ratos espontaneamente hipertensos)
SOD	Superóxido dismutase
SRAA	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
TCA	<i>Trichloroacetic acid</i> (ácido tricloroacético)
TEAC	<i>Trolox equivalent antioxidant capacity</i> (capacidade antioxidante em equivalentes de Trolox)
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i> (fator de crescimento e transformação β)
Thr	<i>Threonin</i> (treonina)
TNBS	<i>2,4,6-trinitrobenzene-1-sulphonic acid</i> (ácido 2,4,6-trinitrobenzeno-sulfônico)
TRAP	<i>Total reactive antioxidant potential</i> (potencial antioxidante total)
Trp	<i>Tryptophan</i> (triptofano)
Tyr	<i>Tyrosin</i> (tirosina)
UF	Ultrafiltração
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
V	Volts
Val	Valina
VC	<i>Voltametria cíclica</i>
VLDL	<i>Very low density lipoprotein</i> (lipoproteína de muito baixa densidade)
VPD	<i>Voltametria de pulso diferencial</i>
VPP	<i>Valil-prolilprolina</i>
WKY	Ratos Wistar-Kyoto
WPC	<i>Whey protein concentrate</i> (concentrado proteico de soro de leite)
WPH	<i>Whey protein hydrolysates</i> (hidrolisados de proteínas do soro de leite)
WPI	<i>Whey protein isolate</i> (isolado proteico de soro de leite)
Zn ²⁺	Íon zinco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	31
1.1 Referências	34
2 REVISÃO DE LITERATURA	36
2.1 Soro de leite	36
2.2 Proteínas do soro de leite	39
2.3 Enzimas proteolíticas	48
2.3.1 <i>Classificação</i>	50
2.3.2 <i>Proteases comerciais</i>	53
2.4 Hidrolisados proteicos	56
2.4.1 <i>Absorção de aminoácidos e peptídeos</i>	56
2.4.2 <i>Importância nutricional dos hidrolisados proteicos</i>	57
2.4.3 <i>Caracterização de hidrolisados proteicos</i>	59
2.4.3.1 <u>Grau de hidrólise</u>	60
2.4.3.2 <u>Perfil peptídico</u>	73
2.5 Peptídeos bioativos: aspectos gerais	77
2.6 Peptídeos com atividade inibitória da enzima conversora da angiotensina	79
2.6.1 <i>Mecanismo de ação de peptídeos inibidores da ECA</i>	80
2.6.2 <i>Atividade inibitória da enzima conversora da angiotensina in vitro</i>	84
2.6.3 <i>Atividade anti-hipertensiva in vivo</i>	87
2.7 Peptídeos com atividade antioxidante	89
2.7.1 <i>Mecanismos de ação antioxidante de peptídeos</i>	92
2.7.2 <i>Atividade antioxidante de hidrolisados proteicos</i>	92
2.7.3 <i>Métodos para avaliação da atividade antioxidante</i>	94
2.8 Referências	101
3 OBJETIVOS	132
3.1 Objetivo geral	132
3.2 Objetivos específicos	132
4 MÉTODOS	133
4.1 Determinação da composição química do concentrado proteico do soro de leite	133
4.2 Preparo dos hidrolisados enzimáticos de WPC	133
4.3 Caracterização do perfil peptídico dos hidrolisados do concentrado proteico do soro de leite	135
4.4 Determinação do grau de hidrólise (GH)	136
4.4.1 <i>Titulação com formol</i>	136
4.4.2 <i>Derivatização com ortoftalaldeído (OPA)</i>	137
4.4.3 <i>Osmometria</i>	137
4.4.4 <i>Teor de proteína solúvel em ácido tricloroacético</i>	138
4.5 Avaliação <i>in vitro</i> da atividade inibitória dos hidrolisados proteicos sobre a enzima conversora de angiotensina	138
4.6 Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos	139
4.6.1 <i>Método do DPPH</i>	139
4.6.2 <i>Método da desoxirribose</i>	140
4.6.3 <i>Método da auto-oxidação do pirogalol</i>	141
4.7 Análise estatística	141
4.8 Referências	142

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	144
5.1 Enzymatic hydrolysis of whey protein concentrate: effect of enzyme type and enzyme:substrate ratio on peptide profile.....	144
5.2 Correlation between the degree of hydrolysis and the peptide profile of whey protein concentrate: effects of the enzyme type and reaction time	166
5.3 Action of a pancreatin and an <i>Aspergillus oryzae</i> protease on whey protein concentrate: correlation among methods of analysis of the enzymatic hydrolysates	200
5.4 Use of different proteases to obtain whey protein concentrate hydrolysates with inhibitory activity toward angiotensin-converting enzyme	229
5.5 Evaluation of the antioxidant activity of hydrolysates from whey protein concentrate: effects of the enzyme type and enzyme: substrate ratio	248
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	271
ANEXOS	275

1 INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença crônica que cresce de forma epidêmica em todo o mundo, atingindo todas as faixas etárias. Apresenta etiologia multifatorial, associando-se a fatores genéticos, ambientais e comportamentais, podendo levar a repercussões de curto e longo prazo inclusive com o desenvolvimento de doenças crônicas não-transmissíveis – DCNT (Buff et al. 2007).

As DCNT vêm aumentando e, no Brasil, constituem a principal causa de óbitos em adultos, sendo a obesidade um dos fatores de maior risco para o adoecimento neste grupo. Assim, a prevenção e a redução dos fatores de risco da obesidade são importantes aspectos para a promoção da saúde e redução de morbimortalidade, não só por ser um fator de risco importante para outras doenças, mas também por interferir na duração e qualidade de vida, e ainda ter implicações diretas na aceitação social dos indivíduos quando excluídos da estética difundida pela sociedade contemporânea (Brasil 2006).

A Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) de 2008-2009 revelou uma mudança nos indicadores antropométricos da população brasileira com menos de 20 anos. Verificou-se que o padrão de crescimento das crianças e adolescentes brasileiros segue na direção do padrão internacional, enquanto que a curva de evolução do peso mediano das crianças brasileiras ultrapassa o padrão esperado, independente da idade e do sexo (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística 2010).

Comparando-se os dados deste último inquérito (POF 2008-2009) com as medições feitas anteriormente no Estudo Nacional de Despesa Familiar – ENDEF, realizado entre 1974-1975 (Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística 1976) e na POF 2002-2003 (Brasileiro de Geografia e Estatística 1974), percebe-se um aumento considerável na proporção de adolescentes brasileiros com excesso de peso. Em 1974-1975, estavam acima do peso 3,9% dos garotos e 7,5% das garotas entre 10 e 19 anos; em 2002-03, os percentuais encontrados foram de 18,0% e 15,4%, respectivamente; já em 2008-2009, o excesso de peso atinge 34,8% dos adolescentes do sexo masculino e 32,0 do sexo feminino.

Este aumento da prevalência de sobrepeso/obesidade na infância e na adolescência é preocupante, uma vez que tende a persistir na vida adulta e, também, traz consigo uma série de comorbidades como dislipidemia, hipertensão arterial sistêmica, problemas psicossociais, alterações do metabolismo da glicose, problemas ortopédicos, apnéia do sono, síndrome dos ovários policísticos e esteatose hepática (Buff et al. 2007; Liberatore Júnior et al. 2008). Por

isso, muita atenção está voltada para a prevenção, o diagnóstico e o tratamento da obesidade na infância.

Entre as diversas ações necessárias para a promoção da saúde da população estão as de promoção de hábitos saudáveis. Dentro do atual contexto epidemiológico, merecem destaque as ações associadas a uma alimentação saudável, à prática regular de atividade física e à prevenção e controle do tabagismo. Todavia, é preciso compreender os diversos determinantes dos comportamentos humanos, que são construções sócio-históricas. Assim, o desafio para os profissionais de saúde seria o de desenvolver intervenções de saúde apropriadas, sem se tornarem reguladores e vigilantes da vida e do prazer alheios (Brasil 2006).

Em todas as fases do curso da vida, as ações de promoção devem assumir como princípio que uma alimentação saudável é aquela adequada em quantidade e qualidade (oferecendo de forma equilibrada todos os nutrientes necessários para cada fase do curso da vida); variada, de forma a facilitar a oferta de todos os nutrientes necessários ao organismo; segura, do ponto de vista sanitário e genético; disponível (garantia do acesso físico e financeiro); atrativa sensorialmente; e que respeita a cultura alimentar do indivíduo ou grupo a que se destina (Brasil 2006).

O uso de suplementos alimentares ou alimentos contendo substâncias bioativas na forma de produtos atraentes para o público infanto-juvenil pode beneficiar este grupo populacional, sendo uma alternativa para minimizar os fatores de riscos de DCNT, como a hipertensão arterial, dislipidemias e estresse oxidativo, os quais frequentemente estão associados à obesidade.

Dentre estas substâncias, destacam-se os peptídeos bioativos encontrados nas proteínas hidrolisadas obtidas através do tratamento enzimático de uma fonte proteica. Estes peptídeos apresentam efeitos benéficos para a saúde, como por exemplo, ação antihipertensiva, hipocolesterolêmica e antioxidante (Silva; Malcata 2005), o que contribuiria para a redução de fatores de riscos para as DCNT, associados ao sobrepeso/obesidade.

Os hidrolisados proteicos são produtos destinados, primeiramente, para uso nutricional de indivíduos que apresentam necessidades nutricionais e/ou fisiológicas não cobertas pela alimentação convencional. Diversos autores têm demonstrado que fórmulas contendo um elevado teor de oligopeptídeos, especialmente, di-tripeptídeos, são utilizadas mais efetivamente pelo organismo do que uma mistura equivalente de aminoácidos livres ou a proteína intacta, apresentando assim um maior valor nutricional. Os hidrolisados proteicos têm recebido ampla atenção nos últimos anos, como principal constituinte de produtos

geriátricos, suplementos de alto valor calórico, soluções parenteral e/ou enteral, fórmulas infantis e alimentos hipoalergênicos (Boza et al. 2000; Pedroche et al. 2004).

O processo de hidrólise enzimática no preparo de hidrolisados proteicos tem se destacado, ao mesmo tempo, por contribuir para a melhoria das propriedades funcionais das proteínas tais como solubilidade, poder emulsificante, textura, tendo grande aplicabilidade em vários produtos alimentícios (Mota et al. 2006). Desta forma, evidencia-se a importância da aplicação da tecnologia de hidrólise no tratamento de proteínas, por permitir a agregação de valor a estas moléculas, tanto do ponto de vista tecnológico como nutricional.

Nesta pesquisa, utilizou-se o concentrado proteico do soro de leite (WPC - *whey protein concentrate*) como fonte de proteínas para o preparo dos hidrolisados proteicos, uma vez que o WPC apresenta elevado percentual de proteínas de alto valor biológico, em virtude de seu perfil adequado de aminoácidos essenciais (Sinha et al. 2007).

O desenvolvimento deste trabalho envolveu a avaliação do efeito de diferentes tratamentos enzimáticos sobre as proteínas do soro de leite na forma de WPC, visando a obtenção de hidrolisados proteicos com elevados teores de oligopeptídeos e que apresentassem propriedades anti-hipertensiva e antioxidante. Neste contexto, diferentes metodologias foram empregadas para acompanhar o processo de hidrólise, bem como para mensurar estas propriedades bioativas *in vitro*. Tudo isso, tendo como perspectiva de que as melhores condições de hidrólise aqui observadas possam vir a ser padronizadas e reproduzidas em larga escala, e que os efeitos benéficos dos hidrolisados proteicos possam ser testados em ensaios clínicos com o público infante-juvenil.

Finalmente, é importante ressaltar que esta tese de doutorado foi elaborada conforme a Resolução 003/2010, do Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Área de Concentração em Saúde da Criança e do Adolescente. Assim, a formatação geral seguiu os padrões da Associação Brasileira de Normas Técnicas (2011), enquanto que o trabalho experimental foi apresentado no formato de artigos científicos a serem submetidos ou já submetidos a revistas científicas.

Desta maneira, esta tese foi estruturada da seguinte maneira:

1. Introdução, que acaba de ser apresentada.
2. Revisão de literatura, apresentada no formato tradicional.
3. Seção de objetivos.
4. Seção de métodos.
5. Seção de resultados e discussão, apresentada sob a forma de cinco artigos:

- a. Artigo “Enzymatic hydrolysis of whey protein concentrate: effect of enzyme type and enzyme:substrate ratio on peptide profile” publicado no periódico *Journal of Food Science and Technology* (Anexo 1).
 - b. Artigo “Correlation between the degree of hydrolysis and the peptide profile of whey protein concentrate hydrolysates: effect of the enzyme type and reaction time” publicado no periódico *American Journal of Food Technology* (Anexo 2).
 - c. Artigo “Action of a pancreatin and an *Aspergillus oryzae* protease on whey protein concentrate: correlation among methods of analysis of the enzymatic hydrolysates” submetido para publicação.
 - d. Artigo “Use of different proteases to obtain whey protein concentrate hydrolysates with inhibitory activity toward angiotensin-converting enzyme”, aceito para publicação no periódico *Journal of Food Biochemistry* (Anexo 3).
 - e. Artigo “Evaluation of the antioxidant activity of hydrolysates from whey protein concentrate: effects of the enzyme type and enzyme: substrate ratio” submetido para publicação.
6. Seção de considerações finais.

Ainda de acordo com a Resolução 003/2010, do Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Área de Concentração em Saúde da Criança e do Adolescente, as referências dispostas após cada seção seguem as normas de Vancouver, enquanto que aquelas listadas após cada artigo estão no formato específico de cada periódico para os quais foram submetidos. Para a formatação desta tese, foram seguidas as normas da NBR 14.724/2011, da Associação Brasileira de Normas Técnicas.

1.1 Referências

Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 14724: informação e documentação: trabalhos acadêmicos: apresentação. Rio de Janeiro 2011.

Boza JJ, Moënoz D; Vuichoud J, Jarret AR, Gaudard-de-Weck D, Ballèvre O. Protein hydrolysate vs free amino acid-based diets on the nutritional recovery of the starved rat. *Eur J Nutr* 2000; 39(6): 237-43.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Obesidade. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 108p. (Série A – Normas e Manuais Técnicos).

Buff CG, Ramos E, Souza FIS, Sarni ROS. Frequência de síndrome metabólica em crianças e adolescentes com sobrepeso e obesidade. *Rev Paulista Ped* 2007; 25(3): 221-6.

Cury A. Revolucione sua qualidade de vida. Rio de Janeiro, RJ: Sextante, 2002. p. 29.

Freire P. Pedagogia da autonomia: saberes necessários à prática educativa. São Paulo, SP: Paz e Terra, 1996. p. 76-7.

Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Estudo Nacional de Despesa Familiar. Rio de Janeiro: IBGE, 1976.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2002-2003: antropometria e estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil. Disponível em <[http:// www.ibge.gov.br/home/xml/pof_2002_2003.shtm](http://www.ibge.gov.br/home/xml/pof_2002_2003.shtm)>. Acesso 29 maio 2013.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009: antropometria e estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil. Disponível em <[http:// www.ibge.gov.br/home/xml/pof_2008_2009.shtm](http://www.ibge.gov.br/home/xml/pof_2008_2009.shtm)>. Acesso 29 maio 2013.

Liberatore Júnior RDR, Cardoso-Demartini AA, Ono AHA, Andrade GC. Prevalência de obesidade em crianças e adolescentes com diabetes melito tipo 1. *Rev Paulista Ped* 2008; 26(2): 142-5.

Mota MVT, Ferreira IMPLVO, Oliveira MBP, Rocha C, Teixeira JA, Torres D et al. Trypsin hydrolysis of whey protein concentrate: characterization using multivariate data analysis. *Food Chem* 2006; 94(2): 278-86.

Pedroche J, Yust MM, Lqari H, Girón-Calle J, Vioque J, Alaiz M, Millán F. Production and characterization of casein hydrolysates with a high amino acid Fischer's ratio using immobilized proteases. *Int Dairy J* 2004; 14(6): 527-33.

Silva SV, Malcata FX. Caseins as source of bioactive peptides. *Int Dairy J* 2005; 15(1): 1-15.

Sinha R, Radha C, Prakash J, Kaul P. Whey protein hydrolysate: functional properties, nutritional quality and utilization in beverage formulation. *Food Chem* 2007; 101(4): 1484-91.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O soro de leite é considerado um subproduto da indústria de laticínios, de baixo valor agregado. Contudo, muitos estudos revelaram que suas proteínas possuem alto valor biológico, exercendo diversas ações funcionais e fisiológicas no organismo humano, as quais podem ser potencializadas pelo tratamento enzimático do soro de leite, resultando na obtenção de hidrolisados proteicos e peptídeos bioativos.

Nesta revisão serão apresentadas algumas características do soro e de suas proteínas, bem como da produção, caracterização e propriedades de hidrolisados proteicos obtidos a partir deste subproduto.

2.1 Soro de leite

O soro lácteo, também conhecido como soro de leite, soro de queijo ou lactossoro, é um subproduto da indústria de laticínios, e representa a porção aquosa do leite que se separa do coágulo durante a fabricação do queijo ou a produção de caseína (Smithers 2008; Pagno et al. 2009). Consiste em um líquido amarelo-esverdeado cuja composição físico-química varia em função do método de fabricação empregado, do tipo de leite, da época do ano, do tipo de alimentação do rebanho e da fase da lactação (Madureira et al. 2007; Carrasco; Guerra 2010).

Este derivado lácteo corresponde a 85-90% do volume de leite utilizado na fabricação de queijos e contém cerca de 55,0% dos seus nutrientes, sendo os principais constituintes a água (93,0-94,0%), a lactose (4,5-5,0% p/v), as proteínas solúveis (0,7-0,9% p/v), as gorduras (0,3-0,5% p/v), os sais minerais (0,6-1,0% p/v) e o ácido láctico (0,1-0,8% p/v) (Sinha et al. 2007; Moreno-Indias et al. 2009;Oliveira et al. 2012). Ainda, é rico em vitaminas, tais como ácido pantotênico, tiamina, riboflavina, vitaminas B6 e B12 (Barbosa et al. 2010).

Há dois tipos de soro fluido, o doce e o ácido, cujas composições dependem do tipo de queijo fabricado e da tecnologia de processamento empregado na produção (Oliveira et al. 2012). O soro ácido é obtido pela acidificação direta do leite, como na produção de queijo *cottage*, cujo pH é comumente inferior a 5,1; e o doce, resultante da coagulação do leite pela adição de renina, com pH geralmente maior que 5,6 (Madureira et al. 2007).

Em geral, o soro doce apresenta maior teor de sólidos totais, proteínas, lactose e lipídeos, mas menor conteúdo de cálcio e fósforo, quando comparado ao soro ácido (Carrasco;

Guerra 2010). Neste segundo tipo, o teor de lactose é ainda menor, pois uma fração deste açúcar é transformada em ácido láctico, devido ao processo de fermentação durante a formação do coalho. Contém, igualmente, maiores teores de peptídeos e aminoácidos, devido à proteólise produzida pelo coalho, bem como contém mais cálcio e fósforo, devido à solubilização do complexo cálcio-fósforo, existente nas micelas de caseína, em pH ácido. Por apresentar sabor ácido e maior conteúdo salino, sua utilização é mais limitada (Miller et al. 2000).

O soro de leite apresenta relevância na indústria de laticínios, tendo em vista o volume produzido, isto é, para a fabricação de 1 kg de queijo gasta-se, em média, 10 litros de leite, gerando cerca de 9 litros de soro (Barbosa et al. 2010). Além disso, devido à grande quantidade de substâncias orgânicas presentes neste subproduto, representada principalmente pela lactose (aproximadamente 70% dos sólidos totais), o soro impõe altos valores de demandas bioquímica (DBO) e química de oxigênio (DQO), superiores a 35 e 65 gramas de oxigênio/litro de soro, respectivamente (Smithers 2008; Moreno-Indias et al. 2009).

Fica claro, portanto, que o soro recebe grande importância quando visto como agente de poluição, devido à sua alta DBO. Por outro lado, também pode ser considerado produto nobre, pelo seu teor de proteínas e peptídeos, lipídeos, vitaminas do complexo B, minerais e lactose. Além de suas propriedades nutricionais, as proteínas do soro ainda apresentam importantes propriedades tecnológicas, funcionais e fisiológicas, que podem ser de grande valia nas áreas biotecnológicas, agro-alimentícia e médica (Smithers 2008; Barbosa et al. 2010).

Neste contexto, a identificação de alternativas para o aproveitamento adequado do soro de leite é de fundamental importância, em função de sua qualidade nutricional, do volume produzido e de seu poder poluente (Oliveira et al. 2012).

Algumas aplicações do soro de leite na forma fluida incluem a alimentação animal (Costa et al. 2010; David et al. 2010; Lima et al. 2011; 2012), a produção de ricota (Porto et al. 2005), a produção de doce de leite (Ferreira et al. 2012), a fabricação de bebida láctea (Gajo et al. 2010; Paula et al. 2012), o uso como ingrediente de produto cárneo (Terra et al. 2009), de panificação e confeitaria (Imamura; Madrona 2008; Zavareze et al. 2008, 2010; Guimarães 2011; Silva et al. 2011), bem como substrato para processos fermentativos (Nery et al. 2008; Barbosa et al. 2010; Beszédes et al. 2010) ou como meio de cultivo de micro-organismos de interesse biotecnológico (Santiago et al. 2004; Nascimento; Martins 2006).

Considerando que o soro fluido não suporta estocagem por períodos prolongados devido a sua alta perecibilidade, são necessárias medidas que visem o melhor aproveitamento deste subproduto (Oliveira et al. 2012). Assim, seu adequado processamento permite a obtenção de vários ingredientes alimentícios, tais como o soro doce em pó (DSW – *dry sweet whey*), o soro desmineralizado e sem lactose (DLMW – *demineralized delactosed whey*) e a lactose refinada (Valduga et al. 2006).

A elaboração destes produtos envolve etapas de aquecimento e secagem do soro fluido (evaporação, atomização ou secagem em *spray*), concentração por osmose reversa, desmineralização por resinas de troca iônica ou eletrodialise, remoção da lactose por cristalização ou tratamento enzimático, bem como processos envolvendo filtração em diferentes tipos de membrana (Brans et al. 2004; Moreno-Indias et al. 2009; Carrasco; Guerra 2010).

Algumas aplicações do soro de leite em suas formas desidratadas incluem a elaboração de sorvetes (Silva; Bolini 2006), de produtos cárneos (Daguer et al. 2010), de produtos de panificação e confeitaria (Valduga et al. 2006; Guimarães et al. 2011), e a produção de hidrolisados proteicos (Delvivo et al. 2006; Lopes et al. 2007; Silva et al. 2007; Souza et al. 2008; Raviraj et al. 2010).

Atualmente, muita atenção tem sido voltada para o papel das proteínas na saúde humana, principalmente em dietas para perda de peso, controle da diabetes, perda de gordura e ganho de massa muscular. Neste sentido, o isolamento de determinadas proteínas do soro de leite tem-se tornado uma alternativa para desenvolvimento de produtos voltados para indivíduos com necessidades nutricionais específicas (Etzel 2004).

Várias técnicas foram desenvolvidas para a separação das proteínas do soro de leite, métodos esses que se baseiam nas diferenças de densidade (ultracentrifugação), de tamanho (separação por membranas de ultrafiltração - UF, microfiltração - MF, nanofiltração - NF, e osmose reversa - OR) e de cargas elétricas (troca iônica ou eletrodialise), na complexação/precipitação com outras substâncias (carboximetilcelulose, metais, metafosfatos etc), ou por aquecimento ou métodos cromatográficos (filtração em gel) (Brans et al. 2004; Etzel 2004; Jovanović et al. 2005; Carrasco; Guerra 2010), as quais permitem a obtenção de concentrados proteicos de soro de leite (WPC – *whey protein concentrate*), com um conteúdo proteico que varia de 35 a 80%; e de isolados proteicos de soro de leite (WPI – *whey protein isolate*), que contêm acima de 90% de proteína (Valduga et al. 2006).

Dentre os produtos assim obtidos, o WPC é um dos mais utilizados na indústria de alimentos, devido às propriedades tecnológicas de suas proteínas, sendo empregado em produtos de panificação, em bebidas e em formulações infantis (Brans et al. 2004), bem como ingrediente de produtos cárneos (Luvielmo; Antunes 2006; Ferreira et al. 2009). Uma importante aplicação dos hidrolisados proteicos consiste no desenvolvimento de formulações contendo elevados teores de oligopeptídeos, destinadas à saúde humana. Nesse sentido, além dos trabalhos de diversos autores (Lara et al. 2005; Cabrera-Padilla et al. 2009, Buckley et al. 2010; Contreras et al. 2011; Dryáková et al. 2011; Lin et al. 2012; Zhang et al. 2012), é importante ressaltar que o Grupo de Pesquisa no qual o presente trabalho está inserido, já desenvolveu diversos estudos buscando o aproveitamento do soro de leite na obtenção de hidrolisados proteicos, com destaque para os voltados para a nutrição clínica (Souza et al. 2008; Silva et al. 2009; Silva et al. 2010; Silvestre et al. 2011a), com teor reduzido de fenilalanina, para pacientes fenilcetonúricos (De Marco et al. 2005; Delvivo et al. 2006; Silvestre et al. 2011b), bem como para a obtenção de peptídeos bioativos (Silvestre et al. 2012).

Pelo exposto, torna-se importante apresentar algumas características das proteínas do soro de leite, o que fundamenta a escolha desta matéria-prima para a produção de hidrolisados proteicos com propriedades bioativas.

2.2 Proteínas do soro de leite

O soro líquido, originário do leite bovino, contém aproximadamente 20% do conteúdo proteico do leite, o que corresponde, em média, de 4 a 7 g/L, das quais as principais são β -lactoglobulina (β -LG), α -lactalbumina (α -LA), soroalbumina bovina (SAB), imunoglobulinas, lactoferrina, lactoperoxidase, transferrina, fração proteose-peptonas, glicomacropéptídeos e algumas enzimas (Etzet 2004; Jovanović et al. 2005; Haraguchi et al. 2006; Madureira et al. 2007). Na tabela 1 estão apresentadas algumas características das principais proteínas do soro de leite.

No que concerne aos aspectos nutricionais destas proteínas, especialmente a β -LG e a α -LA, destacam-se o alto valor biológico, o alto coeficiente de eficiência proteica, assim como os teores de aminoácidos essenciais (triptofano, lisina, treonina, metionina e isoleucina) e sulfurados (cisteína e metionina), comparáveis às proteínas do leite humano (Walzen et al. 2002; Sinha et al. 2007), conforme ilustrado na tabela 2.

TABELA 1 – Propriedades químicas e físico-químicas das principais proteínas do soro de leite.

Proteína	Massa molecular (kDa) ^b	Concentração no soro (g/L) ^b	Ponto isoelétrico (pH) ^a
β-lactoglobulina	18.277	1,30	5,4
α-lactalbumina	14.175	1,20	4,4
Soroalbumina	66.267	0,40	5,1
Lactoferrina	80.000	0,10	7,9
Lactoperoxidase	70.000	0,03	9,6

FONTES: ^a Etzel (2004); ^b Madureira et al. (2007)

Outro aspecto importante refere-se ao elevado teor de aminoácidos de cadeia ramificada - AACR (isoleucina, leucina e valina), os quais estão relacionados com a síntese proteica e a produção de energia nos músculos (Etzel 2004). Além disso, os teores de aminoácidos destas proteínas são superiores às recomendações de ingestão diária para lactantes, crianças e adolescentes, estabelecidas pela Organização Mundial da Saúde (World Health Organisation 2002), como mostrado na tabela 3.

As proteínas do soro de leite ainda são apontadas como nutrientes portadores de atividade funcional, capazes de modular algumas respostas fisiológicas do organismo animal. Estudos realizados em diferentes modelos experimentais (animais, humanos e *in vitro*) têm comprovado a eficácia dessas proteínas na modulação orgânica, com o aumento da capacidade imunomodulatória, aumento no combate a infecções e processos inflamatórios, ação antibacteriana e antiviral, estímulo da absorção e função intestinal, aumento da absorção de minerais, aumento da síntese de hormônios, ação anticancerígena, além do efeito citoprotetor a partir da promoção da síntese de glutathione (Chatterton et al. 2006; Pacheco et al. 2006; Madureira et al. 2007).

Com relação ao poder imunoestimulante das proteínas do soro, sabe-se que ele relaciona-se com o alto conteúdo de cisteína, o que promoveria o aumento da síntese e da concentração de glutathione (GSH) nos tecidos, melhorando a resposta imune e contribuindo no controle do estresse oxidativo (Walzen et al. 2002). Baseado nesta hipótese, há vários trabalhos na literatura (Bounous et al. 1993; Agin et al. 2000, 2001; Micke et al. 2001, 2002; Moreno et al. 2006; Sattler et al. 2008; Velaphi et al. 2008) que abordam o uso destas proteínas na suplementação da dieta de pacientes infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV – *human immunodeficiency virus*). Nestes trabalhos, de forma geral, a maioria dos pacientes que recebeu suplementação proteica diária apresentou aumento do peso corporal

e elevação da concentração de glutatona em células mononucleares, resultando em significativa melhora do quadro clínico.

TABELA 2 – Composição aminoacídica das proteínas do leite humano e das proteínas do soro de leite de vaca.

Aminoácido	Concentração (mg de aminoácido /g de proteína)		
	Proteínas do leite humano ¹	Proteínas do soro de leite ²	
		β -lactoglobulina	α -lactalbumina
Ácido aspártico + asparagina	90	100	170
Ácido glutâmico + glutamina	178	176	118
Alanina	38	54	15
Arginina	23	26	11
Cisteína	17	28	58
Fenilalanina	42	32	42
Glicina	23	9	24
Histidina	21	15	29
Isoleucina	55	62	64
Leucina	96	136	104
Lisina	69	105	109
Metionina	16	29	9
Prolina	80	42	14
Serina	50	33	43
Tirosina	52	36	46
Treonina	44	44	50
Triptofano	17	20	53
Valina	55	54	42

FONTE: ¹ World Health Organization (2002); ² Etzel (2004)

TABELA 3 – Requerimento de aminoácidos essenciais para lactantes, crianças e adolescentes.

Idade	Requerimento (mg aminoácido/g de proteína)								
	His	Ile	Leu	Lis	AAS	AAA	Thr	Trp	Val
Até 6 meses	20	32	66	57	28	52	31	8,5	43
1-2 anos	18	31	63	52	26	46	27	7,4	42
3-10 anos	16	31	61	48	24	41	25	6,6	40
11-14 anos	16	30	60	48	23	41	25	6,5	40
15-18 anos	16	30	60	47	23	40	24	6,3	40
Mais de 18 anos	15	30	59	45	22	38	23	6,0	39

His: histidina; Ile: isoleucina; Leu: leucina; AAS: aminoácidos sulfurados; AAA: aminoácidos aromáticos; Thr: treonina; Trp: triptofano; Val: valina.

FONTE: World Health Organization (2002)

Moreno et al. (2006) conduziram um ensaio clínico duplo-cego prospectivo por quatro meses, envolvendo 18 crianças HIV-positivas infectadas verticalmente (1,98 a 6,37 anos), sob terapia antirretroviral, que receberam proteínas do soro de leite, maltodextrina (placebo) ou nenhum destes compostos (controle). Os autores verificaram que embora não tenha sido detectada alteração na contagem de linfócitos T (CD4+ e CD8+) entre os grupos, as crianças que receberam suplementação proteica apresentaram aumento significativo nos níveis de glutathione nos eritrócitos, fato este que foi relacionado, pelos pesquisadores (Moreno et al. 2006), à menor ocorrência de co-infecções associadas neste grupo.

Há vários relatos na literatura nos quais se avalia o efeito dos componentes do soro de leite no tratamento de cânceres em modelos animais (Bounous et al. 1988; Bezault et al. 1994; McIntosh et al. 1995; Tsuda et al. 1998; Yoo et al. 1998; Hakkak et al. 2000, 2001; Kuhara et al. 2000; McIntosh; Le Leu 2001; Dias et al. 2006), em cultura de células *in vitro* (Laursen et al. 1990; Häkanson et al. 1995; Baruchel; Viaux, 1996; Ikeda et al., 1998; Svensson et al., 2000; Tsai et al. 2000; Roy et al. 2001; Kent et al. 2003; Castro et al. 2009; Attaallah et al. 2012; Ziegler et al. 2012) e em estudos clínicos envolvendo seres humanos (Kennedy et al. 1995; Chmiel 1997; Fischer 2004; Gustafsson et al. 2004). Nestes trabalhos, as principais observações verificadas incluíam a redução do tamanho dos tumores, a inibição da proliferação celular e do crescimento tumoral, assim como a redução de metástases. Todavia, nenhum estudo foi contundente, sendo estes efeitos benéficos das proteínas do soro de leite associados ao aumento da concentração de glutathione, à indução do fator de crescimento e transformação beta (*transforming growth factor-beta* - TGF- β) e à maior atividade das células NK (*natural killer cells*).

A suplementação com proteínas do soro de leite tem efeitos variados em pacientes com hepatites B ou C. Em estudo realizado por Watanabe et al. (2000), 25 pacientes diagnosticados com hepatite B ou C, receberam 12 g de caseína, duas vezes ao dia, por duas semanas e, em seguida, foram suplementados com 12 g de proteínas do soro (Immunocal®), por igual período de tempo. Não foram observadas alterações significativas no quadro clínico dos indivíduos com hepatite C, todavia, em alguns dos pacientes do grupo com o vírus B, verificou-se a melhoria nos marcadores de função hepática, diminuição dos níveis séricos da peroxidase lipídica, bem como aumento um aumento da interleucina-2 e da atividade das células NK.

Com relação ao metabolismo de lipídeos, vários estudos já foram realizados para se avaliar os efeitos da suplementação da dieta com proteínas do soro de leite sobre o perfil de

lipídeos séricos. Em modelos animais (Sautier et al. 1983; Nagaoka et al. 1991, 1992; Kawase et al. 2000; Jacobucci et al. 2001; Haraguchi et al. 2009, 2010), o uso destas proteínas foi capaz de promover redução significativa dos níveis séricos e/ou hepáticos de colesterol total. Algumas hipóteses já foram propostas para explicar este efeito hipocolesterolêmico, incluindo a redução das concentrações das lipoproteínas de muita baixa densidade (*very low density lipoprotein* – VLDL) ou de baixa densidade (*low density lipoprotein* – LDL) (Nagaoka et al. 1991, 1992), alterações no metabolismo das lipoproteínas de alta densidade (*high density lipoprotein* – HDL) (Sautier et al. 1983; Nagaoka et al. 1992; Haraguchi et al. 2010), assim como a redução da absorção intestinal do colesterol dietético (Kawase et al. 2000).

Contudo, os resultados apresentados nestes estudos são conflitantes, uma vez que alguns autores (Choi et al. 1989; Jacobucci et al. 2001; Haraguchi et al. 2009;) também demonstraram que a redução do colesterol total foi acompanhada por aumento da concentração de triacilgliceróis. Além disso, outros autores também relatam que a quantidade de proteína empregada na execução destes experimentos é outro fator que deve ser considerado, tendo em vista que, segundo Zhang; Beynen (1993), somente dietas com teor proteico superior a 30% é que poderiam exercer ação hipocolesterolêmica.

Em estudo realizado com 20 homens adultos, Kawase et al. (2000) também avaliaram o efeito da ingestão de leite fermentado enriquecido com proteínas do soro de leite sobre os níveis séricos de lipídeos. Durante um período de oito semanas, 10 voluntários receberam 200 mL de leite fermentado, enquanto os outros 10 tomaram um placebo (sem proteínas do soro). Os pesquisadores verificaram que, após quatro semanas, o grupo que recebeu o leite fermentado mostrou níveis significativamente maiores de HDL, bem como redução dos triacilgliceróis e da pressão sistólica, quando comparados ao grupo placebo. Além disso, no primeiro grupo também houve uma diminuição do colesterol total e dos níveis de LDL, os quais não foram estatisticamente diferentes do segundo grupo.

Outra hipótese que sustenta a ação redutora de gordura corporal pelas proteínas do soro de leite refere-se ao alto teor de aminoácidos de cadeia ramificada destas proteínas, o que pode controlar a liberação de insulina pós-prandial e maximizar a ação gliconeogênica hepática e, ainda, minimizar a perda de massa magra, tendo em vista que a leucina atua nos processos de síntese proteica (Layman 2003; Layman et al. 2003; Layman; Baum 2004).

Zemel (2004) também demonstrou a perda de gordura corporal em ratos alimentados com soro de leite, como fonte de cálcio, em relação a outras fontes não lácteas. De acordo com estes autores, o aumento da ingestão dietética de cálcio promoveria uma supressão dos

hormônios calciotrópicos, acelerando a lipólise e regulando o armazenamento de triacilgliceróis, o que resultaria na perda de gordura. Além deste mecanismo, Zemel (2003) ainda sugere que este efeito benéfico do cálcio é potencializado por componentes bioativos das proteínas do soro de leite, que promoveriam a melhor regulação do metabolismo energético do tecido adiposo e dos músculos.

Em diversos estudos com modelos animais, a atividade funcional das proteínas do soro de leite também já foi associada à proteção da mucosa gástrica contra lesões ulcerativas (Matsumoto et al. 2001; Rosaneli et al. 2002; Mezzaroba et al. 2006; Pacheco et al. 2006). Nestas pesquisas, este efeito protetor foi relacionado aos teores de cisteína e de ácido glutâmico, com consequente aumento da produção intracelular de glutathiona, a qual possui atividade protetora contra lesões das células da mucosa gástrica por intermédio de mecanismos de citoproteção.

A produção de suplementos proteicos a base de proteínas do soro de leite, para atletas e praticantes de atividade física, é outra área de grande interesse, tendo em vista o alto valor biológico dessas proteínas e ao alto teor de aminoácidos de cadeia ramificada. Todavia, vários em estudos (Burke et al. 2001; Cribb et al. 2007; Tipton et al. 2007; Hulmi et al. 2010) nos quais se avaliou o efeito da suplementação com proteínas do soro, associada ou não a treinos desportivos, sobre o ganho de massa e força musculares, os resultados são controversos.

Neste contexto, percebe-se que muitos estudos vêm demonstrando os benefícios da ingestão das proteínas do soro de leite, em função de suas propriedades nutricionais e funcionais, contudo, verifica-se que ainda são necessários vários estudos para avaliar a real eficácia de seus componentes.

Embora as proteínas do soro de leite possuam elevada digestibilidade e sejam rapidamente absorvidas para a circulação sanguínea, sabe-se que os hidrolisados proteicos contendo oligopeptídeos, especialmente di- e tripeptídeos, são absorvidos numa velocidade maior, tanto em relação às proteínas como aos aminoácidos livres (Pacheco et al. 2006). Além disso, essas proteínas contêm várias sequências de aminoácidos com propriedades bioativas, ou seja, sua hidrólise pode liberar peptídeos capazes de modular respostas fisiológicas no organismo animal, e aos quais tem sido atribuídas atividades imunomoduladora, antimicrobiana, antiviral, antitumoral, anti-ulcerativa, anti-hipertensiva, anticoagulante, opióide, hipocolesterolêmica e antioxidante (Hartmann; Meisel 2007; Hernández-Ledesma et al. 2008).

Outro ponto que merece destaque é que, com as tecnologias de separação de membranas atualmente disponíveis, é possível separar cada fração proteica do soro de leite, as quais também merecem especial atenção.

A β -LG é a principal proteína encontrada no soro de leite de vaca e de outros ruminantes, estando ausente no leite humano embora alguns autores tenham sugerido que pequenas quantidades possam nele aparecer (Chatterton et al. 2006; Hernández-Ledesma et al. 2008). Trata-se de uma proteína relativamente pequena que existe como um dímero em pH fisiológico, sendo que cada monômero contém 162 resíduos de aminoácidos, com massa molecular de aproximadamente 18.400 Da (Madureira et al. 2007; Hernández-Ledesma et al. 2008; Cheison et al. 2010).

Várias substâncias podem se ligar na região hidrofóbica da estrutura da β -LG, conferindo-lhe a habilidade de transportar algumas moléculas, como ácidos graxos, triacilgliceróis, compostos aromáticos, retinol, vitamina D, protoporfirina IX, colesterol e cálcio (Chatterton et al. 2006; Madureira et al. 2007; Cheison et al. 2010). Esta estrutura é consideravelmente resistente aos ácidos e enzimas proteolíticas presentes no estômago, o que talvez justifique sua função carreadora de retinol e de ácidos graxos maternos para o filhote, em animais (Chatterton et al. 2006; Madureira et al. 2007; Hernández-Ledesma et al. 2008). Esta proteína ainda tem papel de transferência de imunidade passiva para o recém-nascido, bem como na regulação do metabolismo do fósforo na glândula mamária (Chatterton et al. 2006; Madureira et al. 2007). Estas duas últimas funções biológicas parecem ser menos importante para bebês humanos, visto que essa proteína está ausente no leite materno (Haraguchi et al. 2006). Em particular, a β -LG pode induzir alergia ao leite bovino em crianças (Shin et al. 2007; Hernández-Ledesma et al. 2008).

Do ponto de vista nutricional, a β -LG destaca-se por seu alto teor de AACR, importante fonte de energia para os músculos, e de cisteína, aminoácido essencial para a síntese de GSH. Não obstante, várias propriedades bioativas têm sido atribuídas a peptídeos derivados da digestão proteolítica da β -LG, tais como a inibição da enzima conversora de angiotensina, bem como atividades antioxidante, antibacteriana, antiviral, imunomoduladora, anticarcinogênica, opióide e hipocolesterolêmica (Nagaoka et al. 2001; Chatterton et al. 2006; Haraguchi et al. 2006; Hernández-Ledesma et al. 2006; Roufik et al. 2006; Madureira et al. 2007; Cheison et al. 2010).

Em termos quantitativos, a α -LA é a segunda mais importante proteína do soro de leite de vaca (15 a 25%) e a principal do leite humano (21 a 34%) (Haraguchi et al. 2006;

Chatterton et al. 2006). Tendo em vista o alto grau de homologia estrutural entre as α -LA de diferentes espécies de mamíferos, esta proteína é frequentemente empregada na elaboração de fórmulas infantis (Chatterton et al. 2006).

Uma das principais funções biológicas da α -LA, que é sintetizada nas glândulas mamárias, refere-se ao fato de que esta proteína está associada ao complexo da lactose sintetase, enzima que catalisa o último passo da biossíntese da lactose no tecido mamário (Walzem et al. 2002; Chatterton et al. 2006). Do ponto de vista nutricional, a α -LA caracteriza-se por ser de uma proteína de fácil e rápida digestão, e por conter o maior teor de triptofano (6%) entre todas as fontes proteicas alimentares, sendo também rica em lisina, leucina, treonina e cistina (Haraguchi et al. 2006). Além disso, em virtude de seu alto teor de triptofano, aminoácido precursor da síntese de serotonina, há relatos de que esta proteína tenha efeitos benéficos no tratamento do declínio cognitivo associado a doenças crônicas induzidas pelo estresse (Chatterton et al. 2006; Madureira et al. 2007).

A esta proteína também tem sido associado efeito anticancerígeno, em virtude de sua habilidade em restringir a divisão celular, bem como por induzir a apoptose de células tumorais (Madureira et al. 2007). Também, apresenta atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas, como, por exemplo, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae* (Haraguchi et al. 2006).

Além disso, vários peptídeos resultantes da hidrólise da α -LA, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, podem exibir propriedades bioativas, tais como a inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA), atividades antioxidante, antibacteriana, antiviral, imunomoduladora, anticarcinogênica, opióide e hipocolesterolêmica (Chatterton et al. 2006; Madureira et al. 2007; Otte et al. 2007). Estudo recente (Catiau et al. 2011) demonstrou, ainda, que hidrolisados de α -LA foram capazes de aumentar a secreção de colecistoquinina a partir de células intestinais, os quais poderiam se relacionar com o controle da saciedade.

A soroalbumina (SAB) corresponde à cerca de 10% das proteínas do soro de leite, embora não seja sintetizada na glândula mamária. Esta proteína possui afinidade por ácidos graxos livres e outros lipídeos, favorecendo o transporte destas biomoléculas na corrente sanguínea (Haraguchi et al. 2006; Madureira et al. 2007). Alguns estudos já demonstraram que a SAB foi capaz de inibir *in vitro* o crescimento de células tumorais de mama (linhagem MCF-7) (Laursen et al. 1990), assim como exibiu forte efeito antiproliferativo em cultura de células epiteliais de hamster (Bosselaers et al. 1994). Além disso, diferentes peptídeos

derivados da hidrólise da SAB também já foram isolados e identificados, apresentando função antioxidante (Tong et al. 2000) e inibidora da ECA (Abubakar et al. 1998).

As imunoglobulinas (Ig) são proteínas de alto peso molecular (150 a 1.000 kDa). Quatro (IgG, IgA, IgM e IgE) das cinco classes das Ig estão presentes no leite bovino, sendo a IgG a mais abundante (cerca de 80% do total), enquanto que no leite humano, a principal fração é de IgA (> 90%) (Haraguchi et al. 2006).

A lactoferrina (LF) é uma glicoproteína monomérica, com massa molecular de 80 kDa, que pode ser encontrada no leite, na saliva, nas secreções nasal e intestinal, no fluido pancreático, no líquido seminal, bem como em neutrófilos. O leite de vaca contém de 0,02 a 0,35 mg.mL⁻¹ de LF, dependendo do período de lactação, enquanto que no leite humano sua concentração pode chegar até 4,0 mg.mL⁻¹ (Madureira et al. 2007). Entre as funções biológicas da LF está a capacidade de fixação de Fe⁺³ e de interação diretamente com a membrana microbiana, tornando-a capaz de inibir multiplicação de bactérias gram-positivas e gram-negativas, bem como de leveduras fungos e protozoários (Madureira et al. 2007). No intestino, exerce ainda função imunoestimulatória e age como fator de crescimento e maturação dos enterócitos (Sgarbieri 2005).

Outras funções biológicas da LF incluem: estimulação do sistema imune, provavelmente por aumentar a atividade de macrófagos; indução da síntese de citocinas inflamatórias; estímulo da proliferação de linfócitos; ativação de monócitos, neutrófilos e células *natural killer*; transporte de ferro; e atividades anti-inflamatória e antitumoral (Sgarbieri 2005; Brisson et al. 2007; Madureira et al. 2007).

O glicomacropéptido (GMP) é encontrado no soro derivado de queijos obtidos pela ação da quimosina. Este peptídeo corresponde à região carboxiterminal da sequência primária da κ -caseína, e concentra os resíduos de aminoácidos ácidos e a maioria dos hidrófilos, sendo por este motivo solúvel no soro de leite (Sgarbieri 2005). É resistente ao calor, à digestão, assim como a mudanças de pH. Apresenta cargas negativas, o que favorece a absorção de minerais pelo epitélio intestinal, e possui alto teor de aminoácidos essenciais (47%) (Haraguchi et al. 2006). Além disso, várias funções bioativas já foram atribuídas ao GMP e incluem atividade anti-hipertensiva, anticariogênica, antitrombótica, antibacteriana, anticariogênica (Hartmann; Meisel 2007; Madureira et al. 2007; Carrasco; Guerra 2010).

Além das proteínas descritas anteriormente, existem outras, porém presentes em pequenas quantidades no soro. Dentre elas, a lactoperoxidase representa quase 1% das proteínas totais do soro, sendo também encontrada na lágrima e saliva. Sua propriedade

antibacteriana tem sido relacionada a sua capacidade de gerar produtos oxidados de ânions tiocianato, presentes em sua estrutura, que são capazes de oxidar grupos sulfidrila de proteínas bacterianas (Madureira et al. 2007). Além desta, outras subfrações presentes no soro são compostas por β -microglobulinas, lisozima, lactolina, relaxina, lactofano, fatores de crescimento IGF-1 e IGF-2, proteose-peptonas e aminoácidos livres (Haraguchi et al. 2006).

2.3 Enzimas proteolíticas

A hidrólise de proteínas alimentares é feita por muitas razões, incluindo melhoria das propriedades nutricionais, funcionais, imunológicas e bioativas destas biomoléculas (Pacheco; Sgarbieri 2005; Cheison et al. 2009). Durante a hidrólise, que pode ser química (ácida ou alcalina), enzimática ou por tratamento térmico, verifica-se o rompimento das ligações peptídicas, sendo formados aminoácidos livres e peptídeos de diferentes tamanhos (Sinha et al. 2007).

Os processos químicos são totalmente inespecíficos, podendo destruir alguns aminoácidos (triptofano, lisina e treonina), causar a racemização de aminoácidos essenciais e promover a formação de substâncias tóxicas, como a lisino-alanina (Sinha et al. 2007). Assim, a hidrólise enzimática apresenta uma série de vantagens sobre o processo químico, tais como a especificidade, as condições moderadas de ação, alta velocidade das reações e a ampla disponibilidade de enzimas para a realização deste processo (Schaafsma 2009). Além disso, o tratamento enzimático contribui para melhorar a digestibilidade sem afetar o valor nutricional da proteína, reduz a alergenicidade da proteína intacta, assim como permite a obtenção de peptídeos biologicamente ativos (Pacheco; Sgarbieri 2005; Sinha et al. 2007; Sarmadi; Ismail 2010).

Um aspecto negativo do processo enzimático está relacionado ao desenvolvimento de gosto amargo no decorrer da catálise, devido à liberação de grupamentos hidrofóbicos que se encontravam no interior das moléculas proteicas (Benítez et al. 2008). Contudo, várias alternativas têm sido usadas para prevenir, eliminar ou mascarar este efeito, tais como o tratamento com carvão ativado, a extração com álcool, a precipitação isoelétrica, a cromatografia em sílica gel, a cromatografia de interação hidrofóbica, a adição de polifosfatos, glicina ou ciclodextrina durante o processo de hidrólise e o uso de exopeptidases (Fitzgerald; O’Cuinn 2006). Outra técnica adotada para reduzir o sabor amargo dos hidrolisados proteicos consiste na sua encapsulação em lipoesferas e lipossomas,

procedimento este utilizado pela mesma equipe do presente trabalho em hidrolisados de caseína obtidos pela ação da papaína (Morais et al. 2004).

A escolha do substrato proteico, das enzimas proteolíticas e o controle das condições hidrolíticas são etapas fundamentais para a obtenção de produtos com qualidade nutricional elevada, propriedades funcionais desejáveis e características sensoriais agradáveis ao consumidor, o que já foi demonstrado em diversos estudos da equipe do presente trabalho (Morato et al. 2000; Morais et al. 2002; Carreira et al. 2004; Lopes et al. 2005; Soares et al. 2006; Souza et al. 2008; Silva et al. 2009; Silvestre et al. 2011a,b).

Para fins industriais, diversas enzimas estão disponíveis comercialmente, vendidas na forma líquida ou em pó, sendo que na área alimentícia, cerca de 60% dessas são proteases (Rao et al. 1998). As proteases também podem ser chamadas de peptidases, proteinases ou enzimas proteolíticas, e representam aproximadamente 2% do número total de proteínas existentes em todos os organismos (Pólgar 2005).

Tendo em vista a diversidade de funções bioquímicas e fisiológicas das enzimas, elas podem ser encontradas em plantas, animais e micro-organismos. O uso de vegetais como fonte de proteases muitas vezes é limitado em função do manejo das plantações, isto é, a necessidade de condições climáticas e de terrenos adequados ao cultivo dos vegetais, assim como os longos períodos para que as plantas atinjam o ponto ideal de colheita. A papaína, a bromelaína e a ficina são algumas das proteases de origem vegetal comumente empregadas na indústria alimentícia. Por outro lado, a obtenção de proteases de origem animal (tripsina, quimiotripsina, pepsina e renina) também é limitada em função da disponibilidade de animais para o abate, o que muitas vezes é governado por questões políticas e agrárias (Rao et al. 1998).

Neste contexto, os micro-organismos representam ampla fonte de enzimas devido a sua diversidade bioquímica e à possibilidade de manipulação genética, assim como podem ser cultivados em grandes quantidades e em períodos curtos de tempo, garantindo assim um fornecimento regular e abundante de enzimas para atender à demanda industrial (Gupta et al. 2002). Neste caso, é importante ressaltar que os micro-organismos fontes destas enzimas não devem ser patogênicos e nem podem produzir compostos tóxicos, como micotoxinas, que permaneçam no produto final. Além disso, na indústria alimentícia, estes preparados enzimáticos devem atender alguns critérios de segurança, que incluem a ausência de contaminantes (micotoxinas, antibióticos etc), riscos mínimos de problemas ocupacionais, como irritação de pele, e inexistência de reações indesejáveis (Schaafsma 2009).

2.3.1 Classificação

O principal sistema internacionalmente aceito para nomear e classificar as enzimas é o da *Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology – NC-IUBMB* (2010), que se baseia na natureza do sítio catalítico e no tipo de mecanismo de hidrólise. Assim, cada enzima recebe um número classificatório EC (*Enzyme Commission*), composto por quatro dígitos separados por pontos.

O primeiro dígito indica uma das seis classes em que são divididas as enzimas, de acordo com as reações que catalisam: 1. Oxirredutases (reações de óxido-redução), 2. Transferases (reações de transferência de grupamentos funcionais como grupos amina, fosfato, acil, carboxil, etc.), 3. Hidrolases (reações de hidrólise de ligação covalente), 4. Liases (reações de eliminação e adição de grupos, formando ou desfazendo ligações duplas), 5. Isomerases (reações de isomerização), 6. Ligases (catálise da ligação de duas moléculas com hidrólise simultânea de ATP). O segundo e o terceiro dígitos indicam a subclasse e a sub-subclasse, respectivamente, enquanto que o quarto dígito é o número de série da enzima em sua sub-subclasse (NC-IUBMB 2010). As proteases, portanto, pertencem à subclasse 4, da classe 3, isto é, enzimas que agem em ligações peptídicas. Conhecendo-se o código EC, é possível se obter informações a respeito das características de uma determinada protease, acessando a base de dados *ExpASY* (<http://expasy.org/enzyme>) (Gasteiger et al. 2003).

Todas as proteases catalisam a mesma reação, isto é, hidrolisam uma ligação peptídica, e são seletivas tanto para a posição da ligação peptídica no substrato, quanto para o tipo de resíduo de aminoácido na ligação a ser quebrada. Estas enzimas, ainda, podem ser classificadas empregando-se o tipo de ação catalítica ou combinando-se o mecanismo de ação catalítica com a estrutura molecular e homologia das enzimas.

Quanto ao tipo de ação catalítica, elas podem ser classificadas como exopeptidases, endopeptidases ou omegapeptidases. As exopeptidases ainda podem ser subdivididas em várias classes, a saber: a) aminopeptidases (subclasse E.C. 3.4.11) ou carboxipeptidases (subclasses E.C. 3.4.16 a 3.4.18), quando liberam um único resíduo de aminoácido, das porções N- ou C-terminal, respectivamente; b) dipeptidil-peptidase (subclasse E.C. 3.4.14) ou peptidil-dipeptidase (subclasse 3.4.15), quando originam um dipeptídeo, das porções N- ou C-terminal, respectivamente; c) tripeptidil-peptidase (subclasse E.C. 3.4.14), que libera um tripeptídeo da porção N-terminal de seu substrato; d) dipeptidase (subclasse E.C. 3.4.13), que

requer que ambas as extremidades esteja livres, isto é, hidrolisam um dipeptídeo (Rawling et al. 2007). As exopeptidases, que atuam na porção C-terminal, ainda podem ser agrupadas como serino, metalo ou cisteíno-carboxipeptidases, baseando-se na natureza do resíduo de aminoácido no sítio ativo da enzima (Rao et al. 1998).

As endopeptidases atuam preferencialmente nas regiões internas das moléculas proteicas, distantes das porções N- e C-terminais. A presença de grupos aminos ou carboxilas livres tem efeito negativo na ação dessas enzimas (Rao et al. 1998). As omegapeptidases (E.C. 3.4.19) não requerem porções N- ou C-terminais livres, embora atuem próximo a elas. Comumente hidrolisam resíduos de aminoácidos substituídos ou ciclizados, bem como ligações isopeptídicas, isto é, ligações nas quais os grupos amino ou carboxila podem não estar diretamente ligados ao aminoácido vizinho (Rawlings et al. 2007).

Outro sistema de classificação, baseado no mecanismo de ação e estrutura molecular, existente desde 1996, é a base MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk>). O princípio organizacional desta base de dados consiste numa classificação hierárquica das peptidases e dos inibidores proteicos homólogos. As espécies proteicas são agrupadas em famílias, considerando-se a similaridade de suas sequências primárias, e em clãs, baseando-se em comparações estruturais. A análise da sequência é restrita a porção da proteína diretamente responsável pela atividade enzimática ou inibitória, sendo chamado de domínio estrutural, sendo que algumas proteínas podem apresentar mais de um domínio (Rawlings et al. 2009).

Neste sistema, cada família é identificada por uma letra maiúscula, referente ao mecanismo de ação das enzimas, que são A (aspártico), C (cisteíno), G (glutâmico), M (metalo), N (asparagina), S (serina), T (treonina), mistas (cisteína, serina e treonina) e U (do inglês *unknown*, desconhecido), seguida por um número de um ou dois dígitos. Por sua vez, todos os clãs são designados por duas letras, sendo que a primeira representa o mecanismo catalítico da família incluída no clã, sendo a letra P empregada caso haja famílias com tipo catalíticos distintos, seguido por uma letra serial (A, B, C, D, etc). Alguns clãs podem ser subdivididos em subclãs, em virtude de divergências com relação a alguns aspectos evolutivos (Rawlings et al. 2010).

As serino, cisteíno e treonino peptidases possuem aminoácidos fortemente nucleofílicos em seu sítio catalítico. O mecanismo de ação destas enzimas é a catálise covalente, que envolve a formação de um intermediário covalente entre a enzima e o substrato. Já na catálise das aspartil, glutamil e metalo peptidase não ocorre ataque nucleofílico por um grupo funcional da enzima, sendo o nucleófilo nesse caso, uma molécula

de água, não havendo, portanto, a formação de um intermediário covalente (catálise ácido-base). Neste tipo de catálise, um resíduo de ácido aspártico ou ácido glutâmico e o zinco, atuam como ácidos e bases (Rawlings et al. 2010).

As serino peptidases constituem o maior grupo de enzimas proteolíticas conhecidas, divididas em 13 clãs e 32 famílias (Rawlings et al. 2010). Elas apresentam um resíduo nucleofílico de serina no sítio ativo, que ataca o grupo carbonila da ligação peptídica do substrato. Sabe-se que a nucleofilicidade da serina é dependente da presença de resíduos de ácido aspártico e histidina no sítio ativo, formando a chamada tríade catalítica (Gupta et al. 2002; Page; Di Cera 2008).

As cisteíno peptidases podem ser agrupadas em 10 clãs (CA, CD, CE, CF, CH, CL, CM, CN, CO, C-) e 59 famílias. O clã CA contém todas as famílias de peptidases que são semelhantes à papaína. Essas enzimas apresentam uma estrutura tridimensional bilobada, composta por dois domínios, no interior dos quais estão localizados os sítios catalíticos. Em adição aos resíduos de Cys e His destes sítios, dois outros resíduos são funcionalmente importantes para a ação dessas enzimas, e incluem a Gln, que forma um centro eletrofílico que estabiliza a estrutura do intermediário covalente entre a enzima e o substrato, e a Asn (ou Asp), a qual auxilia na orientação do anel imidazólico da histidina (Rawlings et al. 2010). Outras enzimas importantes desse clã incluem as calpaínas, as ubiquitinil-hidrolases e as peptidases específicas de ubiquitina.

A classe das treonino peptidases é composta apenas por uma família, que contém o precursor da ornitina acetiltransferase de *Saccharomyces cerevisiae*, cuja autoclivagem origina a enzima em sua forma ativa, que catalisa a reação de transferência do grupo acetil entre a N-acetilornitina e o glutamato (Rawlings et al. 2010).

As proteinases de ácido aspártico são compostas por 6 clãs (AA, AC, AD, AE, AF, A-) divididas em 13 famílias. Representantes característicos estão na família A1, que inclui pepsina, catepsinas D e E, renina e quimosina, que são todas endopeptidases, muitas das quais mais ativas em pH ácido. O sítio catalítico é formado por dois resíduos de ácido aspártico, que ativam uma molécula de água, responsável pelo ataque nucleofílico da ligação peptídica. As enzimas desse grupo apresentam especificidade por resíduos de aminoácidos com cadeias laterais hidrofóbicas e, normalmente, são secretadas na forma de pro-enzimas inativas, com ativação autocatalítica em meio ácido (Rawlings et al. 2010)

As metalopeptidases constituem o tipo catalítico mais diverso das proteases e são caracterizados pela necessidade de um íon metálico divalente para sua atividade e por isso são

inativadas por diálise ou pelo uso de agentes quelantes como o ácido etilenoaminotetracético (EDTA). A maioria das enzimas desse grupo contém uma sequência de His-Glu-Xaa-Xaa-His, no sítio ativo, sendo que os resíduos de histidina são responsáveis pela ligação de zinco, enquanto que o resíduo de ácido glutâmico tem função catalítica. Quanto ao tipo de ação catalítica, este grupo engloba tanto as exopeptidases, quanto as endopeptidases, bem como enzimas de função mista (Rao et al. 1998). As enzimas desse grupo são organizadas em 15 clãs (MA, MC, MD, ME, MF, MG, MH, MJ, MK, MM, MN, MO, MP, MQ, M-) e 59 famílias. As aminopeptidases, a enzima conversora de angiotensina, a termolisina (*Bacillus thermoproteolyticus*) e as carboxipeptidases são representantes bem características deste grupo de enzimas (Rawlings et al. 2010).

O clã das glutamil-peptidases (GA) contém apenas uma família, sendo representada pela endopeptidase do fungo *Scytalidium lignicolum*. A enzima possui resíduos de glutamato e glutamina no sítio catalítico, exercendo sua atividade proteolítica máxima em pH ácido. Acredita-se que essa peptidase esteja relacionada com a nutrição dos fungos nos quais ela é expressa (Rawlings et al. 2010).

As asparagina peptidases (5 clãs, 7 famílias) englobam proteases de vírus e bactérias. A atividade dessas peptidases normalmente é dependente de um resíduo de Asn e de outro resíduo ácido (geralmente Asp) para a catálise de seus substratos (Rawlings et al. 2010).

2.3.2 Proteases comerciais

No presente estudo, foram empregadas proteases comerciais de diferentes fontes (animal ou microbiana) e com distintos tipos de ação catalítica (endopeptidase, exopeptidase e enzimas de função mista). As características dessas enzimas são apresentadas a seguir.

A Alcalase® é uma enzima proteolítica produzida por fermentação de uma cepa selecionada do *Bacillus licheniformis*, sendo que as condições ótimas de hidrólise são temperatura entre 55 e 70 °C, dependendo do tipo de substrato, e pH entre 6,5 e 8,5 (Novoenzymes 2002a). De acordo com Doucet et al. (2003), a principal enzima deste produto comercial é a subtilisina Carlsberg, também chamada de subtilisina A, subtilopeptidase, que consiste de uma simples cadeia polipeptídica de 274 resíduos de aminoácidos, com massa molecular de 27.277 Da e um ponto isoelétrico de 9,4.

As proteases de *Bacillus licheniformis* e enzimas homólogas (clã SB, família S8) fazem parte das serinopeptidases (EC 3.4.21.62), sendo que a maioria são endopeptidases, ativas em pH neutro ou alcalino, e termoestáveis (Rawlings et al. 2010). Alguns tipos dessa

enzima são muito ativas em pH ao redor de 10, sendo por isso, chamadas de proteases alcalinas, enquanto que o ponto isoelétrico fica em torno de pH 9. Apresenta especificidade para resíduos de aminoácidos aromáticos (tirosina e fenilalanina) ou hidrofóbicos, como a leucina. (Gupta et al. 2002). Este tipo de protease também é produzido por diferentes bactérias, com as dos gêneros *Arthrobacter*, *Streptomyces* e *Flavobacterium*, porém as de origem fúngica, principalmente de *Bacillus* sp, são as mais conhecidas (Rao et al. 1998).

A Corolase® PP (pancreatina) é um preparado enzimático proteolítico, obtido de pâncreas suíno, composto por várias enzimas (tripsina, quimiotripsina, e carboxipeptidases). O produto é comercializado sob a forma sólida, apresenta coloração bege e cheiro característico. Apresenta melhor atividade em pH neutro ou levemente alcalino, e temperatura ótima entre 40 e 50 °C (AB Enzymes 2001).

A tripsina (EC 3.4.21.4) e a quimiotripsina (EC 3.4.21.1 e 3.4.21.2) são endopeptidases, exibindo atividade catalítica na faixa de pH de 7 a 10. Elas diferenciam entre si na seqüência de aminoácidos e em suas estruturas tridimensionais, porém apresentam em comum geometria do sítio ativo e mecanismo catalítico (Whitaker et al 2003; Beynon; Bond 2001; Polgár 2005). Com relação as suas especificidades, a primeira cliva preferencialmente ligações peptídicas que contenham resíduos de lisina ou arginina (Hinsberger; Sandhu 2004; Page; Di Cera 2008), já que os grupos ϵ -amino ou guanidina, desses aminoácidos, respectivamente, podem interagir eletrostaticamente com a carga negativa do resíduo de ácido aspártico presente no sítio ativo da enzima (Whitaker et al. 2003). A segunda hidrolisa ligações peptídicas com aminoácidos aromáticos ou básicos (Gupta et al. 2002; Hinsberger; Sandhu 2004; Page; Di Cera 2008). De acordo com a base MEROPS (Rawlings et al. 2010), a tripsina (S01.151) e a quimiotripsina (S01.001) pertencem a família das serino peptidases (S1) e ao clã PA.

A carboxipeptidase A (EC 3.4.17.1) é uma exopeptidase carboxi-terminal, que hidrolisa a ligação peptídica de resíduos com cadeias laterais aromáticas e alifáticas longas, mas com pouca ou nenhuma ação com aspartato, glutamato, arginina, lisina ou prolina (NC-IUBMB 2010). É produzida no pâncreas de animais superiores como um composto de três cadeias polipeptídicas que, por ativação com tripsina, produz a enzima com uma única cadeia polipeptídica, contendo 307 resíduos de aminoácidos, e que apresenta o Zn^{2+} como cofator (Whitaker et al. 2003). Esta enzima também pode ser obtida de outras fontes, como os mastócitos e as células do músculo esquelético (NC-IUBMB 2010). Apresenta pH ótimo na faixa de 7 a 8, sendo seu sítio ativo composto por uma cavidade hidrofóbica contendo Zn^{2+} ,

arginina, fenilalanina e tirosina (Whitaker et al. 2003). Já, a carboxipeptidase B apresenta os mesmos detalhes gerais do mecanismo catalítico da carboxipeptidase A, sendo também secretada com um zimogênio pelo pâncreas (Whitaker et al. 2003). Porém, apresenta preferência pela liberação de lisina ou arginina na porção C-terminal, e pode ser obtida de fibroblastos da pele e na medula adrenal (NC-IUBMB 2010).

Das enzimas mencionadas anteriormente, três são do grupo das serinopeptidases (protease de *Bacillus licheniformis* - EC 3.4.21.62; tripsina - EC 3.4.21.4 e quimiotripsina - EC 3.4.21.1 e 3.4.21.2), ou seja, todas possuem a mesma geometria do sítio ativo (tríade Asp, His e Ser) e, conseqüentemente, o mesmo mecanismo catalítico (Whitaker et al. 2003). As enzimas deste grupo catalisam a hidrólise de ligações peptídicas pelo ataque nucleofílico dos resíduos de aminoácidos do sítio ativo, com doação de um próton, sobre a ligação carbonooxigênio do substrato proteico (Polgar 2005).

A Corolase® LAP é um preparado enzimático proteolítico, contendo exclusivamente atividade de exopeptidase. É um produto derivado de culturas de *Aspergillus sojae*, que apresenta atividade ótima na faixa de pH entre 6,0 e 9,0, e temperatura entre 50 e 70 °C. É comercializada na forma de um líquido marrom claro com cheiro característico e densidade igual a 1,2 g/mL (AB Enzymes 2001). De acordo com a base MEROPS (Rawlings et al. 2010), a enzima pertence ao clã das metaloproteases (clã MH), em cujo centro catalítico estão presentes íons zinco, e à família das aminopeptidases (família M28). De acordo com a NC-IUBMB (2010), essa protease é uma leucil-aminopeptidases (EC 3.4.11.1), capaz de liberar aminoácidos N-terminais, preferencialmente leucina, embora outros aminoácidos possam estar presentes, exceto arginina ou lisina.

A Flavourzyme™ é um complexo de proteases fúngicas, produzida pela fermentação submersa de uma cadeia selecionada de *Aspergillus oryzae*, que não foi geneticamente modificado, e que contém atividade tanto de endo como de exopeptidase. O pH ótimo para este complexo enzimático é na faixa de 5,0 a 7,0, e a temperatura ideal é em torno de 50 °C. (Novoenzymes 2002b). De acordo com a base de dados MEROPS (Rawlings et al. 2010), existem 126 tipos de peptidases produzidas por *Aspergillus oryzae*. Elas podem ser proteases ácidas, neutras ou alcalina, que são ativas na faixa de pH de 4 a 11 e, normalmente, são de ampla especificidade. Entretanto, apresentam baixa velocidade de reação e são menos resistentes ao aquecimento do que as enzimas bacterianas (Rao et al. 1998). Como a Flavourzyme™ é um produto protegido por patente internacional, não é possível identificar qual a composição exata do produto comercial empregado na presente proposta.

2.4 Hidrolisados proteicos

A primeira etapa da digestão proteica ocorre no estômago, onde as proteínas são desnaturadas pelo pH ácido e parcialmente hidrolisadas pela pepsina. No duodeno, as proteases pancreáticas (tripsina, quimiotripsina, elastase, carboxipeptidases A e B) promovem a hidrólise de proteínas e polipeptídeos, produzindo aminoácidos (AA) livres e pequenos peptídeos (2 a 6 resíduos de AA), os quais ainda podem ser hidrolisados pelas peptidases da borda em escova, com formação de mais AA livres, di- e tripeptídeos (Hinsberger; Sandhu 2004). Como os hidrolisados proteicos são constituídos por peptídeos e aminoácidos livres, seu processo de absorção segue os mesmos processos observados para as proteínas da dieta.

2.4.1 *Absorção de aminoácidos e peptídeos*

Com relação à absorção dos AA livres, sabe-se que ela é mediada por cinco diferentes tipos de transportadores, expressos do duodeno ao íleo, mas com maior capacidade de absorção no duodeno (Bröer 2008a,b). Porém, o estudo do mecanismo de absorção intestinal sugere que a taxa de absorção de aminoácidos livres é menor do que aquela dos pequenos peptídeos, porque na absorção de di- e tripeptídeos a competição entre aminoácidos, que compartilham o mesmo sistema de transporte, é parcial ou completamente eliminada (Hinsberger; Sandhu 2004).

O mecanismo de absorção de peptídeos compreende duas proteínas carreadoras, designadas como transportador 1 (PepT1) e transportador 2 (PepT2), que já foram identificadas em mamíferos. O PepT1 é expresso na membrana da borda em escova dos enterócitos, nas células epiteliais do túbulo proximal renal, nas células apicais do duto biliar, nos lisossomas hepáticos e em células pancreáticas. O PepT1 é considerado um sistema de alta capacidade, mas com pouca afinidade, ou seja, ele pode potencialmente transportar os milhares de di- e tripeptídeos, que diferem em estrutura, massa molecular, carga elétrica e polaridade. Já, o PepT2 é amplamente distribuído no organismo, sendo encontrado na glândula mamária, nos pulmões, nos rins, nos sistemas nervoso central e periférico, nas células gliais, no baço e no pâncreas (Brodin et al. 2002; Rubio; Daniel 2002; Daniel; Rubio 2003; Daniel 2004).

Além do ponto de vista nutricional, o PepT1 e o PepT2 são farmacologicamente importantes, uma vez que podem carrear ampla variedade de compostos com diferentes estruturas e características químicas, como antibióticos β -lactâmicos (penicilinas e cefalosporinas), inibidores da enzima conversora de angiotensina – ECA (captopril, enalapril, fosinopril) e inibidores de aminopeptidases, como a bestatina, um fármaco antineoplásico (Rubio; Daniel 2002). Pró-drogas de antirretrovirais (aciclovir, ganciclovir) e de L-DOPA são também reconhecidas e transportadas pelo PepT1 (Brodin et al. 2002).

A assimilação de peptídeos também pode ocorrer por mecanismo paracelular ou na forma de CPP (*cell-penetrating peptides*) (Gilbert et al. 2008). Os CPP são peptídeos com menos de 30 resíduos de aminoácidos, cuja absorção parece ser baseada em processos de endocitose ou por gradientes transmembrana, embora ainda este mecanismo não esteja perfeitamente elucidado (Heitz et al. 2009).

2.4.2 Importância nutricional dos hidrolisados proteicos

Estudos desenvolvidos entre as décadas de 50 e 70 revelaram que peptídeos e aminoácidos, provenientes da hidrólise das proteínas da dieta, são ativamente absorvidos no intestino, por sistemas de transporte independentes (Bröer 2008a). Os AA podem ser absorvidos tanto na forma livre, por difusão simples ou facilitada (transportadores de membrana), quanto na de di- e tripeptídeos (transportadores de oligopeptídeos) (Gilbert et al. 2008).

Além da melhor taxa de absorção e da menor tonicidade dos peptídeos em relação a uma mistura de AA livres (Rubio; Clemente, 2010), o uso de hidrolisados proteicos na nutrição é favorecido pelo fato de que alguns AA, liberados durante a hidrólise, podem funcionar como inibidores das dipeptidases da membrana da borda em escova e, desta maneira, quantidades substanciais de di- e tripeptídeos podem resistir à lise enzimática e alcançarem os transportadores de peptídeos (Daniel 2004). Após absorvidos, eles podem ser hidrolisados pelas peptidases citossólicas e os aminoácidos gerados serem utilizados pelas próprias células ou liberados na circulação por meio de transportadores de aminoácidos presentes na membrana basolateral (Rubio; Daniel 2002).

Com relação à distribuição do peso molecular, sabe-se que hidrolisados contendo peptídeos com massas moleculares entre 5 e 20 kDa são utilizados geralmente como fontes de nitrogênio, em alimentos para fins especiais e suplementos alimentares para adultos. Já,

peptídeos com massas inferiores a 5 kDa são frequentemente utilizados em formulações hipoalergênicas (Neves et al. 2004). Para uso nutricional ou médico, também se sugere que, preferencialmente, os hidrolisados devam ser constituídos por peptídeos contendo de 2 a 6 resíduos de aminoácidos (< 2 kDa), para facilitar sua absorção e diminuir seu sabor amargo e sua alergenicidade (Pacheco et al. 2005).

Neste sentido, uma das aplicações mais importantes de hidrolisados proteicos é sua utilização como fonte de nitrogênio em formulações para dietas enterais para a alimentação infantil ou de adultos enfermos (Benítez et al. 2008). Na alimentação enteral dá-se preferência aos hidrolisados proteicos ricos em peptídeos de baixa massa molecular, devido à excelente absorção gastrointestinal e a sua baixa osmolalidade, sendo estes melhor utilizados pelo organismo do que as proteínas intactas ou os aminoácidos livres (Neves et al. 2004; Benítez et al. 2008).

Os hidrolisados também podem ser utilizados na alimentação de idosos, em suplemento para atletas, em dietas para controle de peso, no tratamento clínico de indivíduos com distúrbios específicos de digestão e absorção, bem como em pacientes com desnutrição associada ao câncer, trauma, queimaduras e problemas hepáticos (Neves et al. 2004; Benítez et al. 2008).

Na nutrição esportiva, sabe-se que uso de proteínas parcialmente hidrolisadas está associada a efeitos insulínolíticos, o que estimula o anabolismo proteico pós-exercício e a glicogênese (Schaafsma 2009). Alguns autores também demonstraram que a ingestão de hidrolisados proteicos, quando comparada com a proteína intacta, acelerou a digestão e a absorção proteicas, promovendo maior disponibilidade pós-prandial de aminoácidos, com consequente aumento na taxa de incorporação destes aminoácidos em proteínas musculares (Koopman et al. 2009).

Outra aplicação importante refere-se ao desenvolvimento de produtos voltados para crianças com distúrbios no metabolismo de aminoácidos, como a fenilcetonúria (De Marco et al. 2005; Bizzotto et al. 2006; Capobiango et al. 2006; Delvivo et al. 2006; Lopes et al. 2006; Soares et al. 2006; Lopes et al. 2007; Silva et al. 2007; Lopes et al. 2008; Carreira et al. 2010) ou com alergia às proteínas do leite ou de outros alimentos (Guadix et al. 2006; Berg et al. 2007, 2008).

Outro campo de estudo e de aplicação para os hidrolisados proteicos é a obtenção de peptídeos pequenos, biologicamente ativos, os quais podem desempenhar várias funções, regulando ou inibindo a atividade enzimática, atuando como antibióticos, hormônios, agentes

antivirais e antibacterianos ou imunomoduladores (Hartmman; Meisel 2007; Erdmann et al. 2008; Schaafsma 2009).

Além dos efeitos benéficos na manutenção do estado nutricional, os hidrolisados proteicos apresentam várias aplicações na indústria alimentícia associadas à melhoria das propriedades funcionais. Neste sentido, estes hidrolisados são utilizados como ingrediente em vários alimentos, como patês, pães, doces, produtos alimentícios fortificados e para crianças (Pacheco et al. 2005; Jovanović et al. 2005).

2.4.3 Caracterização de hidrolisados proteicos

Devido à hidrólise enzimática, ocorrem algumas mudanças das propriedades moleculares das proteínas, observando-se a diminuição da massa, o aumento da carga e a liberação de aminoácidos hidrofóbicos, entre outros fenômenos, os quais podem ser detectados por meio de vários métodos analíticos. Como resultado destas modificações verifica-se alterações em suas propriedades nutricionais, com aumento da digestibilidade e redução da alergenicidade, e em propriedades funcionais, com a liberação de peptídeos bioativos (Benítez et al. 2008).

Neste sentido, a caracterização de hidrolisados proteicos, independente do uso ao qual se destina, é extremamente importante, e pode envolver a determinação do grau de hidrólise (GH), da osmolaridade, da distribuição dos peptídeos de acordo com o tamanho da cadeia, da composição aminoacídica, de modificações químicas que ocorrem durante o processamento de alimentos e da presença de compostos tóxicos (Silvestre 1997; Guadix et al. 2000).

Segundo Benítez et al. (2008), os parâmetros mais utilizados para descrever o resultado do processo de hidrólise são o GH e a distribuição dos peptídeos em função da massa molecular. Assim, neste trabalho, a caracterização dos hidrolisados proteicos envolveu a determinação do GH, por diferentes metodologias, e a avaliação do perfil peptídico, que compreende o fracionamento, de acordo com o tamanho da cadeia, e a quantificação dos peptídeos e de aminoácidos livres. Portanto, a seguir, estão descritos os métodos que, normalmente, são utilizados para a avaliação destes parâmetros.

2.4.3.1 Grau de hidrólise

O grau de hidrólise (GH) é a porcentagem do número de ligações peptídicas clivadas em relação ao número total de ligações peptídicas no substrato, por unidade de peso ou, alternativamente, a relação entre o número de grupos α -amino livres (ou teor nitrogênio α -amino) e o teor de aminoácidos no substrato (ou teor de nitrogênio/proteína total) (Guadix et al. 2000; Nielsen et al. 2001). Ele pode ser calculado de acordo com a equação 1, onde h é o número de ligações peptídicas hidrolisadas e h_{hot} é o número total de ligações peptídicas presentes na proteína nativa (Benítez et al. 2008; Rutherford 2010).

$$\text{GH} = (h / h_{\text{hot}}) \cdot 100 \quad (1)$$

Os diferentes métodos empregados para avaliar o GH baseiam-se em: 1) determinação de grupos α -amino livres; 2) determinação do nitrogênio liberado durante a hidrólise, que se torna solúvel na presença de um agente precipitante, como o ácido tricloroacético (*trichloroacetic acid* – TCA), por exemplo; 3) na titulação de prótons liberados após ruptura das ligações peptídicas; 4) ou por alterações no ponto de congelamento da solução, por meio de osmometria (Silvestre 1997; Guadix et al. 2000; Benítez et al. 2008; Rutherford 2010).

Para a determinação de grupos α -amino livres pode ser utilizada a técnica de titulação com formol, cujos procedimentos de referência podem ser encontrados na *United States Pharmacopeia – USP* (The United States Pharmacopeial Convention 2007) ou nos métodos da *Association of Official Analytical Chemists – AOAC* (Horwitz; Latimer Jr. 2007). Alternativamente, esta análise também pode ser feita empregando-se agentes derivatizantes tais como a ninhidrina (Moore; Stein 1948; Schwartz; Engel 1950; Moore; Stein 1954), o ácido 2,4,6-trinitrobenzeno-sulfônico (*2,4,6-trinitrobenzene-1-sulphonic acid* - TNBS) (Satake et al. 1960; Fields 1971; Adler-Niessen 1979), o ortoftalaldeído (*o-phthalaldehyde* - OPA) (Roth 1971; Church et al. 1983, 1985) e a fluorescamina (Pearce 1979). Além destas técnicas, a orientadora da presente pesquisa já utilizou o método cuprimétrico para a determinação de grupos α -amino livres em hidrolisados proteicos de caseína (Silvestre et al. 1993).

Comumente, para a quantificação do teor de nitrogênio ou proteína solúvel pode-se empregar o método de Kjeldhal ou a detecção espectrofotométrica de proteínas e peptídeos. Muitos métodos espectrofotométricos têm sido propostos para a determinação de proteínas

totais, tais como o de Hull, do biureto, de Lowry, do “*Coomassie brilliant blue*” ou reagente de Bradford, do ácido bicinconínico (*bicinchoninic acid* - BCA) ou reagente de Smith, e da absorção de proteínas, ligações peptídicas ou aminoácidos aromáticos no ultravioleta (Silvestre 1997; Zaia et al. 1998; Benítez et al. 2008), mas nenhum pode ser considerado de uso universal.

O controle da hidrólise enzimática de proteínas pode, ainda, ser realizado pelo método do *pH-stat*. Esta metodologia baseia-se no princípio de que quando a hidrólise é feita em meio neutro ou alcalino, a dissociação dos prótons de grupos amino livres é favorecida. A liberação dos prótons no meio reacional promove uma redução do pH e, desta maneira, a quantidade de base requerida para manter o pH constante durante a reação pode ser correlacionada com o número de ligações peptídicas clivadas (Adler-Nissen 1986). Todavia, este consumo não está diretamente relacionado com o GH, sendo necessário conhecer o pK médio dos grupos α -amino liberados, para se estabelecer esta correlação (Guádix et al. 2000; Benítez et al. 2008).

A depressão do ponto de congelamento também pode ser usada para calcular mudanças na osmolaridade do meio reacional, em função da liberação de peptídeos e aminoácidos durante o processo de hidrólise. Estas alterações podem ser acompanhadas com o uso de crioscópio e, posteriormente, correlacionadas com o GH (Nielsen et al. 2001; Spellman et al. 2003).

Mais recentemente, alguns autores (Roufik et al. 2006) têm proposto a determinação do GH por meio da análise em cromatografia líquida de alta performance-fase reversa (*reversed phase high performance liquid chromatography* - RP-HPLC). Nestes estudos, a diminuição na área do pico de cada peptídeo após a hidrólise é comparada com a área do pico do mesmo peptídeo na amostra controle (incubação sem enzima).

Embora cada técnica apresente suas vantagens e limitações, foram encontrados poucos relatos na literatura que comparavam distintos métodos para avaliar o GH, sendo que em todos se referiam ao uso de agentes derivatizantes e/ou ao método do *pH-stat* (Gwiazda et al. 1994; Panasiuk et al. 1998; Nielsen et al. 2001; Spellman et al. 2003; Blazek 2008; Cheison et al. 2009).

Considerando os diferentes princípios de cada metodologia e que o uso de diferentes enzimas no processo de hidrólise resulta em distintos produtos de proteólise, optou-se neste trabalho por empregar quatro metodologias (titulação com formol, reação com o OPA, teor de proteínas solúvel após adição de TCA e osmometria) para se avaliar o GH dos hidrolisados enzimáticos de WPC. Ressalta-se que tais metodologias nunca foram anteriormente

comparadas e, sendo assim, esta revisão somente abordará alguns aspectos relativos a estes métodos.

Titulação com formol

O método clássico de titulação com formol de Sørensen foi um dos primeiros a ser empregado na determinação quantitativa de aminoácidos. Este procedimento é baseado em uma titulação ácido-básica, onde é feita a medição dos prótons liberados pela reação do formaldeído com os grupos aminos das proteínas, após prévia neutralização com álcali (Silvestre 1997; Denis et al. 2008; Rutherford 2010).

Quando o grupo amino reage com o formaldeído, forma-se um derivado metileno de aminoácido, que é um ácido mais forte que o próprio aminoácido e, desta forma, ele pode ser titulado com uma solução alcalina, na presença de fenolftaleína como indicador. Todavia, os aminoácidos existem como *zwitteranions* e o formaldeído não reage com o grupo amino carregado sendo necessário, portanto, um ajuste do pH da solução antes de se proceder à titulação. Ainda, é importante destacar que o grupo carboxila do derivado metileno do aminoácido permanece livre e também pode ser titulado, o que representa um inconveniente para esta análise (Fraenkel-Conrat; Olcott 1948).

Durante a titulação, uma primeira padronização deve ser feita, isto é, o pH da solução a ser analisada tem que ser ajustado para um valor pré-estabelecido, no qual espera-se que cada grupo α -amino reaja com um equivalente de álcali (Levy 1935). Northrop (1926) propôs que o pH 7.0 é um ponto conveniente para iniciar a titulação, visto que muitos aminoácidos e peptídeos possuem um ponto isoelétrico (pI) entre os valores de pH 6,0 e 7,0, enquanto que as proteínas normalmente são solúveis nesta faixa. Um segundo ajuste refere-se à neutralização da solução de formaldeído, uma vez que a acidez dessa solução pode interferir com o ponto final da titulação (Northrop 1926; Levy 1933). Realizados estes ajustes, pressupõe-se que a quantidade de álcali adicionada, após conveniente subtração de um branco, é tida como equivalente aos grupos α -amino presentes na solução proteica (Denis et al. 2008).

Estes ajustes de pH são necessários, uma vez que alguns aminoácidos contêm outros grupos ácidos ou básicos em suas cadeias laterais, como tirosina, lisina, arginina, histidina, prolina e triptofano, que se não forem adequadamente neutralizados, podem interferir com a titulação (Jodidi 1918, 1926; Levy 1933, 1935). Se uma solução de glicina, neutralizada ou não, é titulada até pH 9,0 (viragem da fenolftaleína), será requerido um equivalente de base, já

que este aminoácido apresenta apenas um grupo α -amino e um grupo carboxila. Por outro lado, para um ácido dicarboxílico, como o ácido glutâmico, a titulação direta da solução consumirá dois equivalentes de álcali, mas se a solução for previamente neutralizada, será necessário apenas um. Para a lisina, que é um ácido diamínico, ocorre justamente o oposto, ou seja, a titulação direta requer somente um equivalente de álcali, enquanto que a titulação após a neutralização precisará de dois (Taylor 1957).

Com relação à tirosina, a presença do grupo fenólico pode superestimar o teor deste aminoácido. No caso da lisina (dois grupos aminos) e da arginina (grupo guanidina), o consumo de álcali durante a titulação dependerá do pH inicial da solução, já que este determinará o grau de protonação das cadeias laterais. Já, a reação da prolina (grupo imino) com o formaldeído, resulta na formação de um grupo metileno, de caráter básico, o que neutraliza em parte o grupo carboxílico da prolina, o que pode subestimar o teor deste aminoácido. Como a histidina (grupo imino) e o triptofano guardam certa semelhança estrutural com a prolina, também produzem resultados semelhantes (Jodidi 1918, 1926; Levy 1935).

Assim, a escolha do pH inicial e final deve ser adaptada à constante de dissociação dos diferentes aminoácidos. Para evitar a titulação dos grupos ácidos (ácidos aspártico e glutâmico) e do grupo imidazole da histidina, o pH inicial deve ser ligeiramente superior a 7,0. Por outro lado, para não se titular o grupo fenol da tirosina, o pH final não pode ser muito maior do que 9,0. Prolina e hidroxiprolina requerem um pH superior a 9,7 (Levi 1933, 1935).

Outro aspecto que pode causar confusão em quem usará o método pela primeira vez, refere-se ao fato de que existem dois tipos de titulação, que são chamadas de direta e de indireta. No método direto, a solução de formaldeído neutralizada (pH 7,0) é adicionada diretamente a solução a ser investigada, cujo pH não foi ajustado, e essa solução é então titulada com álcali. Após a subtração de um branco (solução formaldeído-água ou solução proteína-enzima no tempo zero), o volume de base é utilizado para quantificação do teor de grupos α -aminos. Já no método indireto, a solução proteica é primeiramente titulada com álcali até determinado pH, o formaldeído é adicionado, e a solução obtida é novamente titulada até a viragem do indicador. O valor da segunda titulação, após a subtração de um branco, é então empregado para o cálculo do teor de grupos α -aminos (Taylor 1957).

Procedimentos de referência para a titulação com formol podem ser encontrados na *United States Pharmacopeia – USP and National Formulary – NF* (United States Pharmacopeial 2007) ou nos métodos da *Association of Official Analytical Chemists - AOAC*

(Horwitz; Latimer Jr 2007). Empregando-se o método da USP, o pH da solução teste é ajustado para 7,0, enquanto que o da solução de formol é ajustado para 9,0, procedendo-se a titulação com solução alcalina até se atingir pH 9,0. Já, a técnica da AOAC é baseada no ajuste do pH para 7,0, de ambas as soluções, seguindo-se pela titulação da mistura até a mudança de cor da fenolftaleína (pH 9.2).

Na prática laboratorial, a titulação com formol é um método eficaz, rápido e de reduzidos custos, sendo útil na quantificação do teor de grupos α -amino liberados durante a hidrólise. Neste sentido, esta metodologia já foi empregada para a avaliação do grau de hidrólise de hemoglobina (In et al. 2002), colágeno (Denis et al. 2008), proteínas de camarão (Cao et al. 2009), de peixe (Šližytė et al. 2009; You et al. 2009; Nemati et al. 2012; Wang et al. 2012), de carne de ostra (Zheng et al. 2009), de ovo (Ting et al. 2011), de concentrados e isolados proteicos de soja (Zhao; Hou 2009) e de concentrado proteico de soro de leite (Silva et al. 2009).

Derivatização com ortoftaldeído

A hidrólise de uma ligação peptídica resulta na liberação de um novo grupo α -amino, o qual pode reagir com diversos reagentes cromogênicos ou fluorogênicos (Wallace; Fox 1998). Um dos primeiros agentes derivatizantes empregados na determinação de aminoácidos foi a ninhidrina, que já foi descrita por diversos autores (Ruhemann 1910; Harding; Warneford 1916; Moore; Stein 1948; Schwartz; Engel 1950; Moore; Stein 1954).

Trata-se de uma técnica de grande sensibilidade, que tem como inconveniente a longa duração dos ensaios, bem como a reação não só com aminoácidos, mas também com substâncias que possuem grupos amina. Outros inconvenientes desta metodologia podem ser listados: a sensibilidade da solução de ninhidrina à oxidação pela luz e pelo ar; a diminuição da intensidade da cor com o aumento da concentração de aminoácidos reduzidos; a influência da composição do solvente na velocidade da reação, sendo maior em solventes orgânicos do que em água; a reação com frutose, ácido levulínico, ácido siálico e íons cianeto; a não relação estequiométrica de um equivalente de ninhidrina por grupo amina e a possibilidade de que compostos contendo a alta leitura do branco (Moore; Stein 1948; Troll; Cannon 1953; Meyer 1957; Church et al. 1985; Friedman 2004).

Outro agente derivatizante comumente empregado para a análise de aminoácidos é o TNBS, sendo que o método original foi proposto por Satake et al. (1960). Entre as

desvantagens deste método estão a contaminação do reagente com ácido pícrico; a longa duração da análise; a interferência de açúcares redutores e amônia; a baixa reatividade da prolina e hidroxiprolina; a reação do grupo ϵ -amino da lisina com o TNBS, superestimando o resultado; a interferência do mercaptoetanol, usado para romper as ligações dissulfeto da molécula proteica; a instabilidade do reagente e o risco de explosão (Church et al. 1985; Guádix et al. 2000; Benítez et al. 2008).

Neste contexto, o método da derivatização com o OPA vem recebendo mais atenção, tanto por sua rapidez como por sua segurança. Ele é um agente fluorogênico que reage com moléculas orgânicas contendo grupo amino primário ($-\text{NH}_2$), na presença de um agente redutor e em meio alcalino, originando um composto fluorescente, denominado de isoindole (figura 1). Este composto, na presença de 2-mercaptoetanol (2-ME), foi empregado por Roth (1971) para a detecção fluorimétrica de aminoácidos livres e pequenos peptídeos ($\text{MM} < 6000$ Da). O mecanismo de reação, determinado por Simons; Johnson (1976), revelou que o derivado OPA-aminoácido é fluorescente (λ excitação = 350 nm; λ emissão = 450 nm), enquanto que o OPA livre não fluoresce.

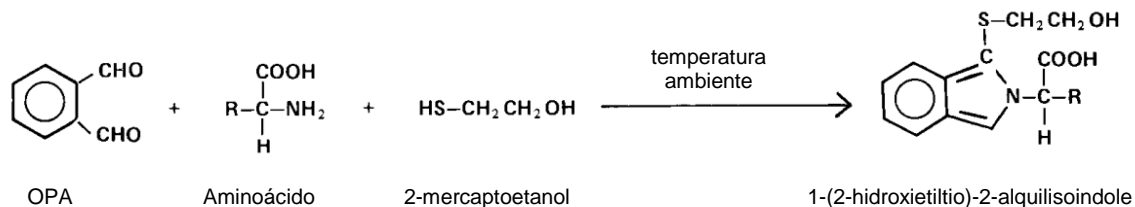


Figura 1 – Reação de derivatização do orto-ftalaldeído (OPA) com aminoácido.

Fonte: Adaptado de Dai et al. (1997).

Posteriormente, Church et al. (1983) desenvolveram um ensaio espectrofotométrico, determinando a absorvância, a 340 nm, dos derivados formados pela reação do OPA com os grupos α -amino liberados durante a hidrólise de proteínas do leite, na presença de mercaptoetanol. Os autores verificaram que o tipo de cadeia lateral do aminoácido não afetou significativamente a absorvância do cromóforo formado. Além disso, perceberam que a presença de ligações peptídicas, bem como de quantidades constantes de β -lactoglobulina intacta também não interferiam com a absorvância das amostras, nem com a linearidade do método.

Enquanto o método fluorimétrico é mais sensível que o espectrofotométrico, a fluorescência dos peptídeos é substancialmente menor que a dos aminoácidos individuais e, além disso, a fluorescência de vários aminoácidos não é constante. Desta maneira, o uso da fluorimetria para monitorar e quantificar a extensão da proteólise não é tão prática quanto o ensaio realizado pelo método espectrofotométrico (Church et al. 1985).

Algumas características especiais que tornam este ensaio um método desejável para avaliação de proteólise incluem a solubilidade e estabilidade do reagente em meio aquoso; a rapidez da reação com aminas primárias (cerca de dois minutos), em temperatura ambiente; a sensibilidade do ensaio em detectar concentrações da ordem micromolar; a reação com 18 dos 20 aminoácidos comuns; uso da mesma solução de reagentes (OPA, 2-mercaptoetanol e dodecil sulfato de sódio) tanto para inibir a atividade proteolítica quanto para o desenvolvimento da cor; a facilidade de manipulação dos reagentes; os baixos valores de absorvância do branco, e o reduzido custo por ensaio (Church et al. 1983, 1985; Dai et al. 1997). Outras vantagens deste método, quando comparados com outros agentes derivatizantes, incluem a rápida reação de derivatização em temperatura ambiente, a alta sensibilidade devido às características espectrais do derivado isoindole formado, a facilidade de manipulação do reagente e o baixo custo por ensaio (Dai et al. 1997).

Esta metodologia apresenta como inconvenientes a ausência de reação do OPA com a prolina, a reação parcial com a cisteína e a interação com a cadeia lateral da lisina com superestimação do GH (Benítez et al. 2008; Rutherford 2010). Além disso, o derivado isoindol formado entre o OPA e os aminoácidos, na presença de mercaptoetanol, é instável e se degrada rapidamente. Assim, outros reagentes tiólicos têm sido usados nesta análise, incluindo N-acetil-L-cisteína (NAC), etandiol, ditiotretol e cloreto de N, N-dimetil-2-mercaptoetil amônio (DMA), em substituição ao mercaptoetanol (Dai et al. 1997; Rutherford 2010).

Contudo, é importante destacar que, de acordo com Church et al. (1983), quando o método do OPA é empregado com proteínas com alto teor de lisina, como as do soro de leite, é necessário a realização do teste com uma amostra não hidrolisada, porque desta maneira, seria possível determinar a reação com os grupos ϵ -amino da lisina e, conseqüentemente, acompanhar a reação com os grupos α -aminos liberados durante a hidrólise.

Observa-se, ainda, que o método de derivatização com OPA é muito utilizado na avaliação do GH, em diferentes fontes proteicas, tais como caseína (Pralea et al. 2011), caseinato de sódio (Nielsen et al. 2001), proteínas do soro de leite (Spellman et al. 2003;

Dryáková et al. 2010; Leksrisompong et al. 2010; Stanciuc et al. 2010), α -lactalbumina (Barros et al. 2003), ovo (Chen et al. 2009), peixe (Batista et al. 2010), ervilha (Panasiuk et al. 1998), soja (Nielsen et al. 2001; Peñas et al. 2004; Martínez et al. 2009; Nesterenko et al. 2012), feijão (Szymkiweicz; Jędrychowski 2008; Chel-Guerrero et al. 2012), arroz (Paraman et al. 2007), trigo (Wang et al. 2007; Nagy et al. 2009) e resíduos de cervejaria (Celus et al. 2009).

Determinação de nitrogênio solúvel após precipitação com ácido tricloroacético

Esta metodologia também é conhecida como índice de solubilidade em ácido tricloroacético (*trichloroacetic acid* - TCA) ou método de nitrogênio não proteico. Neste ensaio, mensura-se o teor de nitrogênio solúvel, considerando que este corresponda somente a aminoácidos e pequenos peptídeos. Desta maneira, não determina o número de ligações peptídicas rompidas e, assim, não avalia diretamente o grau de hidrólise (Rutherford 2010). Neste procedimento, o uso de um agente precipitante, como o TCA, é essencial, visto que permite a separação total ou parcial de proteínas e peptídeos de alta massa molecular presentes nos hidrolisados, sendo que a taxa de precipitação dependerá do tipo de proteína e precipitante, bem como de suas respectivas concentrações (Carreira et al. 2003).

Após a adição do agente precipitante, a amostra deve ser centrifugada para a separação da proteína precipitada, sendo determinados os teores de nitrogênio do sobrenadante e da matéria-prima, para então se calcular o GH, conforme a equação 2 (Rutherford 2010).

$$\text{Índice de solubilidade - TCA (\%)} = \frac{\text{nitrogênio solúvel - TCA}}{\text{nitrogênio total da amostra}} \times 100 \quad (2)$$

Esta metodologia apresenta como vantagem a rapidez da análise, porém assumir que o nitrogênio solúvel corresponde a apenas a aminoácidos livres e pequenos peptídeos pode ser um inconveniente. Além disso, a separação incompleta da proteína não hidrolisada pela ação de um agente precipitante, bem como a interferência de glicoproteínas na realização desta análise são outras desvantagens associadas ao método (Rutherford 2010).

As técnicas mais usuais para determinação do teor de nitrogênio ou proteína solúvel são o método de Kjeldahl ou a detecção espectrofotométrica de proteínas e peptídeos (Benítez et al. 2008; Rutherford 2010). O procedimento de Kjeldahl é um método baseado na determinação do nitrogênio, envolvendo três etapas. Na primeira, a amostra é submetida a

tratamento com ácido sulfúrico, durante a qual o nitrogênio orgânico é convertido em sulfato de amônio. Na segunda, o material digerido é alcalinizado, sendo a amônia destilada e incorporada em solução de ácido bórico. Na última etapa, a solução obtida é submetida à titulação ácido-base. Assumindo-se que as proteínas do leite contêm cerca de 15,7% de nitrogênio, um fator de 6,38 é utilizado para converter o teor total de nitrogênio em proteína total da amostra. As vantagens desta técnica são a repetibilidade e a aplicabilidade em amostras sólidas ou semi-sólidas, mas alguns inconvenientes são o tempo gasto na realização da análise, a interferência de compostos nitrogenados não proteicos (fosfolipídeos, ácidos nucleicos e açúcares aminados) e a exposição inevitável a produtos químicos corrosivos e perigosos (Wallace; Fox 1998).

Muitas técnicas espectrofotométricas têm sido propostas para a determinação de proteínas totais, mas não existe uma considerada de uso universal para todos os meios reacionais (Zaia et al. 1998). Assim, podem ser utilizados os métodos de Hull, do biureto, de Lowry, do “*Coomassie brilliant blue*” ou reagente de Bradford, do ácido bicinconínico (*bicinchoninic acid* - BCA) ou reagente de Smith, e da absorção de proteínas, ligações peptídicas ou aminoácidos aromáticos no ultravioleta (Silvestre 1997; Wallace; Fox 1998; Zaia et al. 1998).

O método por biureto foi proposto por Riegler (1914), baseado na observação de que substâncias contendo duas ou mais ligações peptídicas formam um complexo de coloração violeta-roxa com sais de cobre, em soluções alcalinas. Posteriormente, diversas modificações foram propostas ao método original (Autenrieth; Mink 1915; Autenrieth 1917; Hiller 1927; Fine 1935; Kingsley 1939), sendo que as mais importantes as de Robinson; Hodgen (1940), que propuseram o uso da soro-albumina como padrão nas análises espectrofotométricas, e as de Gornall et al. (1948), que sugeriram o uso de tartarado de sódio como um complexante que estabiliza o cobre em solução.

Esta metodologia apresenta como vantagens a rapidez, a simplicidade, os custos reduzidos e a especificidade por ligações peptídicas, ao contrário do método de Kjeldal, que determina nitrogênio total. Porém, esta metodologia possui como desvantagens a necessidade de uma curva de calibração tomada com um padrão conhecido de proteína, e o fato de que a cor formada no complexo não é idêntica para todas as proteínas. Por outro lado, os desvios causados são menores do que em outros métodos colorimétricos (Nielsen 2003).

O método conhecido como de Lowry foi originalmente proposto por Wu (1922), que desenvolveu uma técnica colorimétrica baseada na reação da tirosina com o ácido

fosfomolibdênio-tungstico (reagente fenol), para quantificação de proteínas plasmáticas. Posteriormente, Folin; Ciocalteu (1927) demonstraram que a intensidade do pigmento azul formado a partir da reação entre proteínas e o reagente fenol era proporcional ao conteúdo de tirosina e triptofano da amostra. Finalmente, Lowry et al. (1951) sistematizaram todas estas observações em um único método para a quantificação de proteínas, sendo esta considerada como a metodologia padrão na realização desta análise.

O princípio do método de Lowry baseia-se numa mistura contendo molibdato, tungstato e ácido fosfórico (reativo de Folin-Ciocalteu), que sofre redução quando reage com proteínas, na presença do catalisador cobre, e produz um composto com absorção máxima em 750 nm. Postula-se que esta redução ocorra diretamente através das cadeias de alguns aminoácidos (tirosina, triptofano, cisteína, asparagina e histidina), que contribuem com quatro elétrons, ou através da retirada de dois elétrons de cada unidade tetrapeptídica dos peptídeos e proteínas, que é facilitada pela formação do quelato entre o cobre e peptídeos/proteínas (Zaia et al. 1998).

A principal vantagem do método de Lowry é a sua alta sensibilidade. Todavia apresenta uma série de desvantagens tais como o grande número de substâncias interferentes (guanina, xantina, ácido úrico, RNA, cisteína etc), o longo tempo de análise, possuir absorvidade variável para diferentes proteínas e seguir a lei de Lambert-Beer apenas numa pequena faixa de concentração de proteínas (Zaia et al. 1998). Várias modificações têm sido propostas a este método, com destaque para aquelas de Hartree (1972), as quais permitiram ampliar a faixa de linearidade e uniformizar as absorvidades específicas para algumas proteínas. Além disso, para a eliminação da maioria dos interferentes, sugere-se a precipitação das proteínas utilizando-se o TCA (Zaia et al. 1998; Nielsen 2003).

O método de Lowry pode ser substituído pelo de Bradford (1976), que se baseia no fato de que o corante *Coomassie Brilliant Blue* BG-250 pode apresentar duas cores, a vermelha e a azul. De acordo com Zaia et al. (1998), o corante se liga a proteínas que contêm aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas, provocando o deslocamento do equilíbrio do corante para sua forma aniônica, que absorve em 595 nm. Existem vários corantes (amido preto 10B, laranja ácido 12, laranja G, eritrosina B, etc) que podem ser empregados neste tipo de análise, sendo estes métodos geralmente conhecidos como *dye-binding* ou ligação a corantes (Wallace; Fox 1998).

Apesar do método de Bradford ser mais rápido, sensível e estar sujeito a um número bem menor de interferentes que o método de Lowry, o mesmo apresenta algumas

desvantagens, tais como a variação da absorvidade específica para diferentes proteínas, devido à baixa solubilidade ou baixa massa molecular das mesmas e, fornecimento de resultados nem sempre reprodutíveis devido ao grau de pureza do corante BG-250, que varia conforme a procedência, sendo recomendável a padronização das condições de reação (Zaia et al. 1998; Nielsen 2003).

Outra técnica que também pode ser empregada para a determinação do teor de nitrogênio/proteína solúvel é o método de Smith ou do ácido bicinconínico – BCA (4-4'-dicarboxi-2,2'-biquinolina), que se baseia na reação de cobre II com proteínas, em meio alcalino, produzindo cobre I e formando um complexo com o BCA, que absorve na região de 560 nm (Zaia et al. 1998). As vantagens desta técnica incluem a sensibilidade comparável ao método de Lowry, a estabilidade do reagente, e a ausência de interferência de sais tamponados e reagentes desnaturantes com a realização das análises. Por outro lado, assim como observado no método de Lowry, há variação de cor entre os diferentes tipos de proteínas e qualquer composto capaz de reagir com íons cobre pode alterar a formação da cor (Nielsen 2003).

Além dos métodos colorimétricos anteriormente mencionados, a determinação do teor de nitrogênio/proteínas também pode ser feita pela detecção de aminoácidos, na região de 280 nm (fenilalanina, tirosina, triptofano, histidina, cisteína e metionina), ou de ligações peptídicas, na região abaixo de 220 nm. As vantagens desta técnica são não destruição da amostra e a rapidez da análise, todavia, sua principal limitação deve-se ao fato de que, em amostras complexas, diversas substâncias absorvem no ultravioleta, tornando os resultados menos confiáveis (Silvestre 1997; Zaia et al. 1998).

Na literatura, as diferenças observadas nos vários trabalhos, que empregaram a determinação do teor de nitrogênio solúvel para avaliação do GH, referem-se a mudanças na concentração da solução de TCA, na velocidade da centrifugação das amostras e nos métodos empregados na determinação do nitrogênio/proteína solúvel, conforme exemplificado na Tabela 4. Ressalta-se que não foram encontrados relatos na literatura que utilizassem o método de Lowry para a determinação do GH de concentrado proteico de soro de leite, sendo este um dos motivos pelos quais se optou por empregar esta metodologia no presente estudo.

Tabela 4 – Parâmetros empregados na determinação do grau de hidrólise pelo índice do nitrogênio/proteína solúvel em ácido tricloroacético.

Proteína	Solução de TCA	Centrifugação	Determinação de nitrogênio/proteína		Referência
			Solúvel	Total	
Concentrado proteico de soro de leite	13,6 g%	Não mencionado	Kjedhal		Margot et al. (1994)
Carne/víscera de peixe	20,0 g%	10 000 rpm	Kjedhal		Hoyle, Merritt (1994)
	15,0 g%	3 000 g, 15 min	TNBS	Kjedhal	Choi et al. (2009)
	6,25 g%	Não mencionado	Lowry	Kjedhal	Centenaro; Sallas-Mellado (2008)
					Centenaro et al. (2009)
					Santos et al. (2009)
	20,0 g%	6.700 g , 20 min	Kjedhal		Ovissipour et al. (2009)
20,0 g%	8000 g, 20 min, 10 °C	Ovissipour et al. (2010)			
				Molla; Hovannisyan (2011)	
				Amiza et al. (2012)	
				Herpandi et al. (2012)	
Lagosta	0,3 mol.L ⁻¹	Não mencionado	Teor de tirosina		Baek, Cadwallader (1995)
Hemoglobina bovina	27,0 g%	8 000 g, 10 min	Kjedhal		In, Chae, Oh (2002)
Trigo	20,0 g%	3 000 g	Kjedhal		Drago; González (2001)
Isolado proteico de soja	10,0 g%	10 000 rpm, 15 min, 4 °C	Kjedhal		Martins (2005)
Carne de frango	6,25 g%	Não mencionado	Lowry	Kjedhal	Schmidt; Sallas-Mellado (2009)

TCA = ácido tricloroacético; TNBS = ácido trinitrobenzenosulfônico; rpm = rotações por minuto; g = força da gravidade;

Osmometria

A osmometria é uma técnica que permite a determinação da concentração de partículas em solução, isto é, a osmolaridade (Lord 1999). Quando um soluto é dissolvido em um solvente, este tem suas propriedades coligativas usualmente alteradas, em proporção direta com a concentração de solutos (Koumantakis; Wyndham 1989). Observa-se o aumento da pressão osmótica e do ponto de ebulição, assim como diminuição do ponto de congelamento e da pressão de vapor. Teoricamente, qualquer uma das propriedades poderia ser empregada na determinação da osmolaridade, porém, a depressão do ponto de congelamento é o método mais utilizado, sendo avaliada por meio de um osmômetro (crioscópio) (Lord 1999).

Neste sentido, o GH pode ser avaliado pela osmometria, tendo em vista que durante o processo de hidrólise proteica ocorre a liberação de peptídeos e aminoácidos, o que promove alteração da osmolaridade do meio reacional. Assim, pode-se avaliar a depressão do ponto de congelamento da solução, que é então correlacionada com o grau de hidrólise (Nielsen et al. 2001), de acordo com a fórmula proposta por Adler-Nissen (1986):

$$\text{GH (\%)} = \left(\frac{\Delta C}{P\% \times f_{\text{osm}}} \right) \times \left(\frac{1}{\omega} \right) \times \left(\frac{1}{h_{\text{tot}}} \right) \times 100$$

Onde ΔC é a osmolaridade (mOsmol.L^{-1}); $P\%$ é a concentração proteica (g de proteína/kg de água); $1/\omega$ é o fator de calibração do osmômetro, o qual representa o recíproco do coeficiente osmótico dos peptídeos, que se assume ser um valor constante de 1,04; e h_{tot} é o número total de ligações peptídicas na proteína, que para o soro de leite é de 8,8 mEq/g de proteína do soro.

A determinação do GH por osmometria é uma técnica simples e rápida, sendo que o funcionamento do osmômetro não é afetado pela presença de material insolúvel na mistura hidrolítica (Mahmoud; Cordle 2000). Todavia, esta metodologia não deve ser empregada quando as soluções apresentam alta viscosidade ou com grande quantidade de sais. Além disso, a presença de compostos não proteicos na solução, que também podem ser hidrolisados, podem dificultar a correlação das osmolaridade com o valor do GH das proteínas (Nielsen et al. 2001; Doucet et al. 2003). Outra vantagem desta técnica refere-se ao fato de que pequenos volumes de amostra, na ordem de microlitros, são requeridos para a realização das análises, e

não há necessidade de nenhum tipo de preparo das amostras a serem utilizadas no osmômetro (Koumantakis; Wyndham 1989; Grattoni et al. 2008).

Por outro lado, algumas desvantagens da medição da depressão do ponto de congelamento são: a redução da solubilidade dos solutos, que diminui exponencialmente com a temperatura, que pode resultar em precipitação dos solutos; melhor aplicabilidade em soluções com molaridade inferior a 500 mmol.L^{-1} e de baixa viscosidade, e em amostras sem partículas suspensas, que podem agir como núcleos de cristalização (Grattoni et al. 2008).

Foram encontrados poucos relatos na literatura que abordassem o emprego da osmometria na avaliação do GH de proteínas, sendo esta metodologia empregada na avaliação deste parâmetro em amostras de caseína (Dzwolak; Ziajka 1999), de isolados (Ju et al. 1995; Otte et al. 1996; Doucet et al. 2001) ou de concentrados proteicos de soro de leite (Briczinski; Roberts 2002).

2.4.3.2 Perfil peptídico

Uma vez determinado o GH, a caracterização de hidrolisados proteicos pode prosseguir, avaliando-se o tamanho médio das cadeias peptídicas dos hidrolisados, bem como a distribuição de peso molecular dos peptídeos e o teor de aminoácidos livres (Kanekanian et al. 2000; Benítez et al. 2008), obtendo-se, desta maneira, o chamado perfil peptídico dos hidrolisados proteicos.

Esta análise é fundamental na predição da capacidade antigênica, assim como para mostrar diferenças provocadas pelos distintos pré-tratamentos do substrato ou pela ação enzimática (Benítez et al. 2008). Além disso, como mencionado anteriormente (Neves et al. 2004; Pacheco et al. 2005), a distribuição de tamanho dos peptídeos é um fator essencial na predição do uso adequado dos hidrolisados, seja para a elaboração de produtos alimentícios ou emprego na nutrição clínica. Comumente, utilizam-se técnicas eletroforéticas ou cromatográficas para a caracterização do perfil peptídico de hidrolisados proteicos.

A caracterização do perfil peptídico é, igualmente, relevante, tendo em vista que fórmulas contendo um elevado teor de oligopeptídeos, especialmente, di- e tripeptídeos, são utilizadas mais efetivamente do que uma mistura equivalente de aminoácidos livres, apresentando assim um maior valor nutritivo (Boza et al. 2000; Pedroche et al. 2004). Além disto, as soluções de hidrolisados proteicos contendo di- e tripeptídeos possuem menor osmolaridade do que as soluções de aminoácidos livres e, por isto, são mais bem toleradas por indivíduos com dificuldade de absorção (Benítez et al. 2008).

O valor nutricional dos hidrolisados proteicos também depende da presença, em quantidade significativa, de determinados aminoácidos na forma de pequenos peptídeos, os quais, quando livres, apresentam problemas com relação à estabilidade e solubilidade. Assim, a tirosina e a cistina são pouco solúveis, a glutamina e a cisteína são instáveis em solução e facilmente destruídas durante as etapas de esterilização e armazenamento. Entretanto, sob a forma de di- e tripeptídeos, estes aminoácidos apresentam boa solubilidade e estabilidade, o que mostra a importância do isolamento destes peptídeos de hidrolisados proteicos (Clemente 2000). Por este motivo, a caracterização nutricional destas preparações pode envolver a quantificação destes aminoácidos nas diferentes frações peptídicas (Silvestre et al. 1994a; Morato et al. 2000).

A eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (*SDS-PAGE - sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) é uma das técnicas frequentemente empregadas na caracterização de hidrolisados de diferentes fontes proteicas, tais como soja (Peñas et al. 2004; Takeiti et al. 2004; Martins 2005; Zhao; Hou 2009), feijão (Torruco-Uco et al. 2009), ervilha (Szymkiewicz; Jędrychowski 2008); cevada (Chanput et al. 2009), arroz (Chanput et al. 2009), trigo (Nagy et al. 2009), peixe (Monterrey-Quintero; Sobral 2000; Ovissipour et al. 2009), ovo (Chen et al. 2009), caseína (Gallagher et al. 1994; Pardo; Natalucci 2002; Lira et al. 2010; Rubio; Clemente 2010) e proteínas do soro de leite (Schimidt; Poll 1991; Peña-Ramos; Xiong 2001; Peña-Ramos et al. 2004; Spellman et al. 2005; Almaas et al. 2006; Kim et al. 2007; Shin et al. 2007; Zeece et al. 2008; Chicón et al. 2009; Lin et al. 2012).

Embora a eletroforese em gel seja uma técnica simples e que permite a análise simultânea de várias amostras (Kanekanian et al. 2000), tem como limitações o longo período de tempo gasto na preparação e corrida das amostras, no preparo do gel e nas etapas de lavagem e revelação, e o grande volume de soluções normalmente requerido para a realização das análises (Anema 2009). Além disso, vários autores relatam a dificuldade de detectar pequenos peptídeos (< 2 000 Da), uma vez que estes podem ser removidos durante os procedimentos de lavagem e revelação do gel (Schimidt; Poll 1991; Farvin et al. 2010), sendo também difícil a separação de peptídeos com massas moleculares semelhantes ou que apresentem cargas elétricas (Kanekanian et al. 2000).

Diante do exposto, a eletroforese em gel pode ser substituída pela eletroforese capilar, na qual a separação é conduzida em tubos com dimensões de 15 a 100 μm de diâmetro interno, e 50 a 100 cm de comprimento, preenchidos com um eletrólito condutor, e submetidos à ação de um campo elétrico. O uso do capilar oferece muitas vantagens sobre os

outros meios utilizados para eletroforese (placas de gel, papel, etc). Devido a fatores geométricos (a relação entre a área superficial interna e volume é apreciavelmente grande), um capilar possibilita a dissipação eficiente do calor, gerado pela passagem da corrente elétrica (efeito Joule). Além disto, a alta resistência elétrica do capilar permite o estabelecimento de campos elétricos elevados (100 a 500 V.cm⁻¹), resultando em separações de alta eficiência, resolução inigualável e tempos de análise apreciavelmente curtos. Outras vantagens da eletroforese capilar são: pequena demanda de amostra, com volumes tipicamente da ordem de 1 a 10 nL, e a possibilidade de injeção e detecção em fluxo (Tavares 1997).

Apesar de todas estas vantagens, esta metodologia ainda é pouco explorada na caracterização do perfil peptídico, com poucos relatos na literatura (Bergman et al. 1991; Zahou et al. 2000; Amarowicz et al. 2004; Pacheco; Sgarbieri 2005) abordando o emprego desta técnica na análise de hidrolisados proteicos.

Em escala laboratorial, as técnicas cromatográficas são as mais utilizadas para a caracterização de hidrolisados. Dentre estas, umas das mais comuns é a cromatografia de exclusão molecular (CEM), também conhecida como de permeação ou de filtração em gel (Guadix et al. 2006; Kong et al. 2008; Li et al. 2008; Ren et al. 2008; Bougatef et al. 2009; You et al. 2009; Barkia et al. 2010; Bougatef et al. 2010; Hsu et al. 2010; You et al. 2010), a qual também existe no modo de cromatografia de exclusão molecular de baixa pressão (*Low pressure size exclusion chromatography – LPSEC*) (Penã-Ramos et al. 2004) ou no de cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE (*size exclusion high performance liquid chromatography – SE-HPLC*) (Otte et al. 1996; Saint-Sauveur et al. 2008; Dong et al. 2010; Hsu et al. 2010; Leksrisompong et al. 2010; Ting et al. 2011).

Outros métodos também têm sido descritos, com a CLAE de fase reversa (*Reversed phase high performance liquid chromatography – RP-HPLC*) (Nogueira et al. 2005; Hernández-Ledesma et al. 2006; Roufik et al. 2006; Kim et al. 2007; Hsu et al. 2010; Herpandi et al. 2012; Lin et al. 2012; Zambrowicz et al. 2012), a CLAE de troca iônica (Ren et al. 2008; Zhang et al. 2010), a cromatografia de interação hidrofílica (*Hydrophilic interaction chromatography – HILIC*) (Alpert et al. 1990; Zhu et al. 1991; Carreira et al. 2002) e, mais recentemente, a cromatografia líquida rápida de proteínas (*Fast protein liquid chromatography – FPLC*) (Je et al. 2007; Slizyte et al. 2009).

Trabalho pioneiro relacionado ao fracionamento de hidrolisados proteicos foi desenvolvido por Lemieux; Amiot (1990). Estes autores avaliaram diferentes técnicas empregadas para a separação de peptídeos (CLAE nos modos de exclusão molecular, fase

reversa e troca iônica; filtração em gel e cromatografia de afinidade por metais) de um hidrolisado comercial de caseína, tendo verificado que a combinação da CLAE-EM e a CLAE-FR foi eficiente na separação de mais de 200 tipos diferentes de peptídeos, enquanto que nenhum dos métodos foi eficiente na separação dos peptídeos com massa molecular inferior a 1000 Da.

Com relação à CLAE-FR, em diferentes estudos (Lemieux et al. 1991; Visser et al. 1992; Nogueira et al. 2005) foram relatados alguns inconvenientes desta técnica, tais como a dificuldade de separar os peptídeos de acordo com o tamanho da cadeia, a superposição de picos de compostos com massas moleculares diferentes e a ocorrência de interações eletrostáticas e/ou hidrofóbicas entre os solutos e a fase estacionária. Além disso, a hidrofobicidade dos aminoácidos pode interferir com o tempo de eluição de peptídeos com menos de 15 resíduos, enquanto que para peptídeos maiores, o comprimento da cadeia também influencia no tempo de retenção (Kanekanian et al. 2000; Ven et al. 2001; Benítez et al. 2008).

O fracionamento de oligopeptídeos de acordo com o tamanho da cadeia apresenta problemas complexos, pois envolve a interação dos solutos com o suporte cromatográfico (Lemieux; Amiot 1990; Li-Jun et al. 2007). Neste sentido, a orientadora da presente pesquisa desenvolveu um método eficiente para este fim, empregando uma coluna cromatográfica de exclusão molecular contendo o complexo poli-2-hidroxietilaspártamida sílica (PHEA), que lhe possibilitou separar peptídeos com massas moleculares menores do que 1000 Daltons. Paralelamente (Silvestre et al. 1994a,b) também elaboraram um método conhecido como Área Corrigida da Fração (ACF), que lhe possibilitou quantificar os teores de peptídeos e de aminoácidos livres dos hidrolisados fracionados.

Este método já foi usado em vários trabalhos no mesmo laboratório do presente estudo para fracionar e quantificar os peptídeos de diversas fontes proteicas, como hidrolisados enzimáticos de caseína (Morato et al. 2000; Carreira et al. 2003, 2004; Morais et al. 2005); de soro de leite (Delvivo et al. 2006; Silva et al. 2007; Souza et al. 2008), de leite desnatado (Lopes et al. 2005; Soares et al. 2006, 2007), de concentrado protéico de soro de leite (Silva et al. 2009, 2010; Silvestre et al. 2011a), de arroz (Lopes et al. 2008) e de farinha de trigo (Carreira et al. 2010, 2011).

Outra técnica cromatográfica que também já foi explorada na separação de peptídeos é a cromatografia de interação hidrofílica (HILIC). Esta metodologia foi apresentada pela primeira vez por Alpert (1990) para a separação de substâncias hidrofílicas como proteínas, peptídeos e ácidos nucleicos, baseada em interações hidrofílicas entre os solutos e a fase

estacionária hidrofílica, isto é, os solutos são eluídos da coluna em ordem de hidrofílicidade. Este perfil de eluição tende a ser o oposto daquele obtido por CLAE-FR (Zhu et al. 1991; Yoshida, 2004).

Assim, Zhu et al. (1991) empregaram esta técnica na separação misturas de peptídeos sintéticos, usando diferentes tipos de colunas. Eles observaram que a variação do pH e da hidrofílicidade da coluna de poli-sulfoetilaspártamida, com baixas concentrações de acetonitrila, permitiu a separação da mistura de peptídeos sintéticos. Segundo Yoshida (2004), a acetonitrila é o solvente normalmente usado na HILIC, devido à sua baixa viscosidade e, além disso, ela pode ser associada a alguns ácidos como o trifluoroacético, fórmico e acético. Desta maneira, o tempo de retenção dos peptídeos aumenta com sua polaridade (hidrofílicidade), com a polaridade da fase estacionária e com a diminuição da concentração de acetonitrila na fase móvel.

A HILIC também já foi empregada, em um estudo do grupo de pesquisa da orientadora do presente trabalho, para a separação e quantificação de aminoácidos essenciais em hidrolisados de caseína (Carreira et al. 2002). Foi, então, demonstrado que esta metodologia era mais vantajosa em termos de tempo, economia e simplicidade para a análise proposta, quando comparada a outras técnicas de determinação dos aminoácidos, uma vez que dispensa a derivatização pré-coluna e permite trabalhar em modo isocrático.

2.5 Peptídeos bioativos: aspectos gerais

Peptídeos bioativos podem ser definidos como sequências de aminoácidos que se encontram inativas nas proteínas, mas que após sua liberação tornam-se ativos, sendo capazes de modular respostas fisiológicas no organismo. Usualmente, contêm de 2 a 20 resíduos de aminoácidos e massa molecular inferior a 6 000 Da, e suas estruturas primárias definem suas atividades bioativas, dentre as quais se destacam a imunomoduladora, a antimicrobiana, a antiviral, a antitumoral, a hipocolesterolêmica, a antiúlcera, a anti-hipertensiva, a anticoagulante, a opióide, a moduladora dos fatores de crescimento celular, a antioxidante e a carreadora de metais. Além disso, muitos destes compostos ainda são multifuncionais e podem exercer mais de um dos efeitos anteriormente mencionados (Hartmann; Meisel 2007; Erdmann et al. 2008; Möller et al. 2008; Sarmandi; Ismail 2010).

A obtenção destes peptídeos pode ocorrer de diferentes maneiras: a) *in vivo*, a partir da digestão por enzimas do trato gastrointestinal ou por enzimas derivadas de plantas e microorganismos; b) durante processos fermentativos microbianos; c) *in vitro*, pela ação de

proteases; d) pela síntese de peptídeos sintéticos idênticos aos naturais (Dziuba; Darewicz 2007; Hartmann; Meisel 2007; Erdmann et al. 2008; Möller et al. 2008; Sarmadi; Ismail 2010).

Com relação especificamente à hidrólise enzimática, as proteínas de origem vegetal ou animal são as mais utilizadas para a obtenção de peptídeos bioativos. Dentre estas últimas, o destaque é para as do soro de leite, que são ricas em aminoácidos aromáticos e hidrofóbicos, cujas estruturas parecem ser fundamentais para que os peptídeos derivados destas proteínas exerçam diversas atividades bioativas (Chatterton et al. 2006; Hernández-Ledesma et al. 2006; Hartman; Meisel 2007; Hernández-Ledesma et al. 2008; Möller et al. 2008).

A estrutura dos peptídeos bioativos é diversa, e pode englobar tanto di-tripeptídeos, bem como oligo e polipeptídeos, os quais ainda podem ser modificados no organismo por reações de glicosilação, fosforilação ou acilação (Dziuba; Darewicz 2007). Os peptídeos bioativos podem produzir efeitos locais (no trato gastrointestinal) ou sistêmicos. Neste segundo caso, eles devem ser resistentes à ação das enzimas digestórias e, após absorvidos ao longo do intestino, devem permanecer intactos até atingirem o(s) órgão(s) alvo(s), sem sofrerem ação das peptidases séricas (Hayes et al. 2007a,b; Erdmann et al. 2008; Möller et al. 2008).

É importante ressaltar que, como discutido anteriormente nesta revisão, embora se acreditasse que as proteínas fossem absorvidas apenas na forma de aminoácidos livres ou di-tripeptídeos (Hinsberger; Sandhu 2004), atualmente sabemos que existem diferentes sistemas de transporte de oligopeptídeos, que incluem o mecanismo paracelular, a difusão passiva, endocitose e o transporte mediado por carreadores presentes na membrana da borda em escova do intestino (Hayes et al. 2007a,b; Gilbert et al. 2008).

Embora seja necessário o fracionamento de hidrolisados proteicos visando a obtenção de peptídeos específicos para a realização de determinados testes biológicos e estudos estruturais ou que explorem a relação estrutura-atividade, o custo associado às metodologias de separação empregadas, tais como a cromatografia e o uso de membranas, podem tornar inviável a utilização de peptídeos na indústria alimentícia. Neste sentido, no presente estudo decidiu-se por avaliar as propriedades bioativas dos hidrolisados proteicos como um todo, tendo em vista que estes seriam os produtos a serem utilizados no desenvolvimento de novas formulações alimentícias ou dietéticas.

Além disso, diante da diversidade de funções que os peptídeos podem exercer, esta pesquisa foi direcionada para a avaliação das propriedades anti-hipertensiva e antioxidante dos hidrolisados, tendo em vista que a hipertensão e o estresse oxidativo são condições

intimamente relacionadas com várias doenças crônicas não-transmissíveis. Desta maneira, estas serão as únicas propriedades bioativas a serem discutidas nesta revisão.

2.6 Peptídeos com atividade inibitória da enzima conversora da angiotensina

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma condição clínica multifatorial caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial (PA). Associa-se frequentemente a alterações funcionais e/ou estruturais dos órgãos-alvo (coração, encéfalo, rins e vasos sanguíneos) e a alterações metabólicas, com consequente aumento do risco de eventos cardiovasculares fatais e não-fatais (Sociedade Brasileira de Cardiologia 2010).

A HAS apresenta alta prevalência e baixas taxas de controle, e é considerada um dos principais fatores de risco modificáveis e um dos mais importantes problemas de saúde pública. A mortalidade por doença cardiovascular (DCV) aumenta progressivamente com a elevação da PA, de forma linear, contínua e independente. As DCV são ainda responsáveis por alta frequência de internações, ocasionando custos médicos e socioeconômicos elevados (Sociedade Brasileira de Cardiologia 2010).

Diferentes fatores de risco também estão associados à HAS tais como idade, gênero e etnia, excesso de peso e obesidade, ingestão excessiva de sódio, ingestão de álcool por períodos prolongados, sedentarismo e genética (Sociedade Brasileira de Cardiologia 2010). Todavia, é importante destacar que embora a HAS no adulto seja uma condição bem definida, com parâmetros de normalidade estabelecidos, vários estudos vêm relatando a alta prevalência desta condição em crianças e adolescentes, com taxas variando entre 4,8% a 52,4% (Zanoti et al. 2009; Araújo et al. 2010; Costa et al. 2010; Hoffmann et al. 2010; Pinto et al. 2011; Reuter et al. 2012), e, de forma geral, nestes estudos o sobrepeso/obesidade foi a mais importante condição associada com a elevada pressão arterial nas crianças e adolescentes. Assim, neste grupo populacional, a intervenção mais correta consiste em reduzir a ingestão energética, mas também em aumentar o nível de atividade física, uma vez que a elevada PA na infância é fator preditor de hipertensão arterial na vida adulta (Lurbe et al. 2009).

Neste contexto, fica claro que a detecção, o tratamento e o controle da HAS são fundamentais para a redução de eventos cardiovasculares, sendo que as abordagens terapêuticas e preventivas para a HAS visam combater os fatores de risco para esta doença. Assim, as principais recomendações não-medicamentosas para prevenção primária da HAS são: alimentação saudável, consumo controlado de sódio e álcool, ingestão de potássio,

combate ao sedentarismo e ao tabagismo. Entretanto, é preciso ressaltar que estes hábitos saudáveis de vida devem ser adotados desde a infância e adolescência, respeitando-se as características regionais, culturais, sociais e econômicas dos indivíduos (Lurbe et al. 2009; Sociedade Brasileira de Cardiologia 2010).

Por outro lado, o tratamento farmacológico da HAS visa à redução da morbidade e da mortalidade cardiovascular do paciente hipertenso. Os agentes anti-hipertensivos devem promover a diminuição da PA e dos eventos cardiovasculares fatais e não fatais. Estes medicamentos são basicamente divididos nas seguintes classes: diuréticos, inibidores adrenérgicos, vasodilatadores diretos, bloqueadores dos canais de cálcio, inibidores da enzima conversora da angiotensina (ECA), bloqueadores do receptor AT_1 da angiotensina II e inibidores diretos da renina (Lurbe et al. 2009; Sociedade Brasileira de Cardiologia 2010).

Todavia, o uso destes fármacos sintéticos pode gerar efeitos colaterais indesejáveis, devido à sua alta atividade e especificidade. Uma alternativa seria o uso de peptídeos bioativos, representando uma forma de tratamento saudável e natural no controle da hipertensão. Assim, na área de alimentos, vários estudos têm sido desenvolvidos com o objetivo de identificar peptídeos que auxiliem no controle da hipertensão, reduzindo os riscos de DCV, por meio da dieta (Lahogue et al. 2010). Neste sentido, muita atenção tem sido voltada para o estudo de peptídeos que apresentem atividade anti-hipertensiva, principalmente aqueles que inibem a enzima conversora de angiotensina I – a ECA (Erdmann et al. 2008).

2.6.1 Mecanismo de ação de peptídeos inibidores da ECA

Classicamente, o controle da pressão arterial está associado ao sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), no qual a renina circulante cliva seu substrato, o angiotensinogênio, liberando o decapeptídeo angiotensina I (Ang I), que é convertido pela ECA em angiotensina II (Ang II), um octapeptídeo. Em adição, a ECA também faz parte do sistema calicreína-cinina, no qual hidrolisa a bradicinina, que é um potente vasodilatador (Li et al. 2004; López-Fandiño et al. 2006; Hayes et al. 2007b; Möller et al. 2008; Simões e Silva; Flynn 2012).

A ECA, ou quinase II, é uma dipeptidil-carboxipeptidase (EC 3.4.15.1), que existe como duas isoenzimas, transcritas por um único gene, localizado no cromossomo 17. A principal forma é a ECA endotelial (somática), presente nas células endoteliais vasculares, cujo principal sítio de ação é o pulmão, embora também exista no plasma, no interstício e intracelularmente. O segundo tipo (ECA tissular) é encontrado nos principais órgãos,

incluindo coração, cérebro, vasos sanguíneos, adrenais, rins, fígado e órgãos reprodutórios (Li et al. 2004; Simões e Silva; Flynn 2012). Uma representação do papel da ECA na regulação da pressão arterial está ilustrada na figura 2.

A Ang II é um octapeptídeo considerado como o principal mediador do clássico SRAA. É um potente vasoconstritor e, desta forma, aumenta a PA. Ele também estimula a liberação de aldosterona pelas adrenais, o que resulta na reabsorção de sódio e água, contribuindo ainda mais para a elevação da PA. Seus efeitos fisiológicos são mediados pela interação com os receptores AT₁ e AT₂ (Simões e Silva; Flynn 2012). Os principais efeitos destes receptores estão sumarizados na tabela 5.

Independentemente de seus efeitos na PA, a Ang II, via interação com o receptor AT₁, também contribui para a remodelagem do ventrículo esquerdo, alterações na morfologia e propriedades mecânicas da vasculatura e desenvolvimento de disfunções vasculares. Por outro lado, sob condições fisiológicas, o receptor AT₂ basicamente antagoniza as ações mediadas pelo AT₁ (Simões e Silva; Flynn 2012).

Outra enzima, chamada de ECA2 ou carboxipeptidase insensível ao captopril, que é homóloga à ECA, também já foi descrita. Sua ação consiste em hidrolisar a Ang II, com formação de um heptapeptídeo (Ang-(1-7)), mas não metaboliza a bradicinina. Em adição, acredita-se que a diminuição da atividade da ECA2 esteja envolvida na patogênese de doenças renais (Simões e Silva; Flynn 2012).

Em virtude de seu papel essencial no desenvolvimento da HAS, a busca por inibidores da ECA sempre foi muito intensa, sendo os primeiros descobertos em veneno de cobra. Desde então, inibidores sintéticos tais como o captopril, enalapril, alecepril e lisinopril são usados no tratamento da hipertensão, a despeito de seus efeitos colaterais, como hipotensão, tosse, aumento dos níveis séricos de potássio, redução da função renal e angioedema (López-Fandiño et al. 2006; Pavar et al. 2006).

Neste contexto, a busca por outros inibidores com menos efeitos colaterais é intensa, sendo que peptídeos ou hidrolisados proteicos tem sido muito pesquisados. Assim, sabe-se que peptídeos que inibam a ação da ECA, podem diminuir a PA e, conseqüentemente, contribuir na redução de risco de DCV. Estes peptídeos inibidores contêm de 2 a 15 resíduos de aminoácidos por molécula, e a maioria deles apresenta a sequência Ala-Pro ou Pro-Pro na porção C-terminal (Li et al. 2004; López-Fandiño et al. 2006).

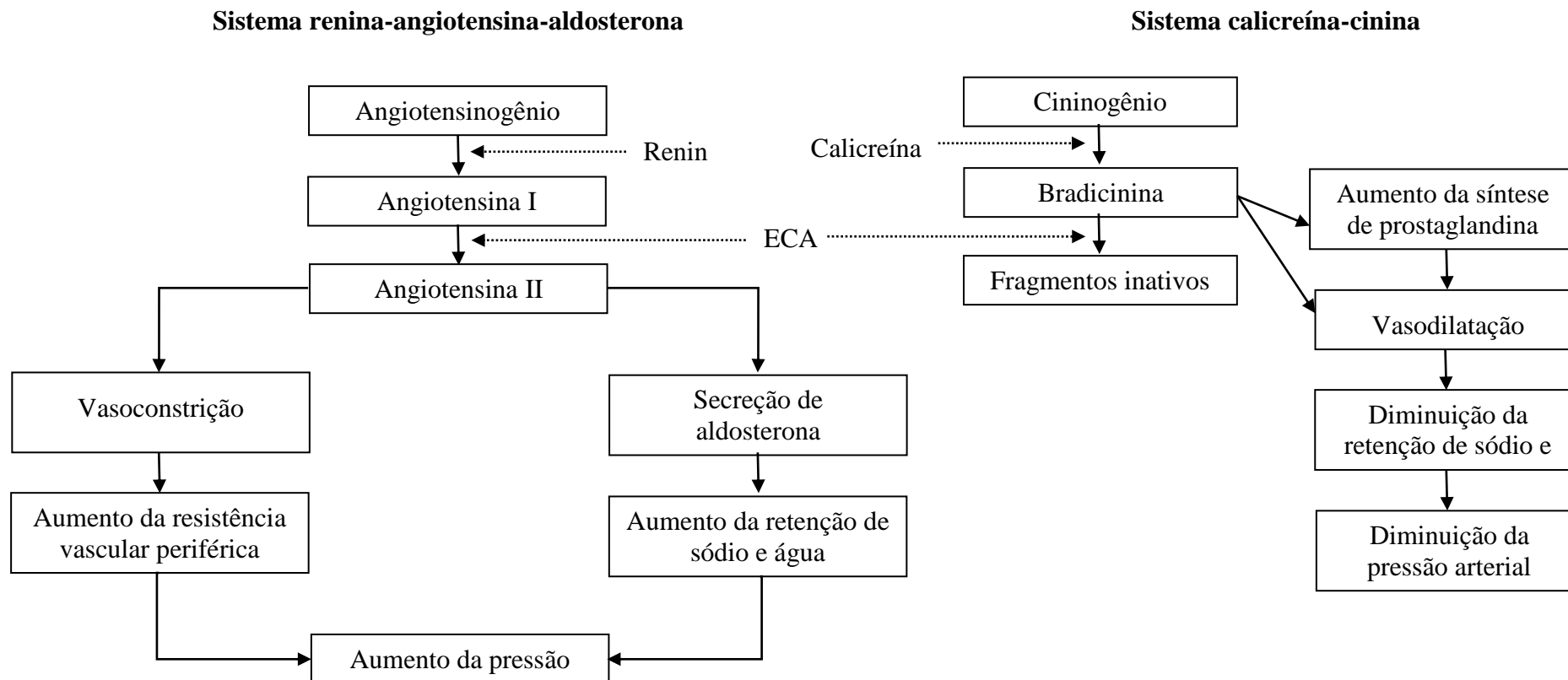


Figura 2 – Ação da enzima conversora de angiotensina (ECA) na regulação da pressão sanguínea.

Fonte: Li et al. (2004).

Tabela 5 – Comparação dos principais efeitos dos receptores AT₁ e AT₂.

Recetpor AT₁	Recetpor AT₂
Vasoconstrição	Vasodilatação
Reabsorção tubular de sódio	Natriurese
Secreção de aldosterona, endotelina e vasopressina	Produção de óxido nítrico
De-diferenciação celular, proliferação e hipertrofia	Diferenciação celular
Ativação do sistema nervoso simpático	Inibição da proliferação celular e da formação de matrix
Produção de superóxido	Apoptose
Peroxidação lipídica	Síntese de colágeno
Expressão da molécula adesina	Supressão da secreção de renina
Expansão da matrix vascular	Antiangiogênese

Fonte: Simões e Silva; Flynn (2012)

A correlação entre a estrutura/atividade anti-hipertensiva dos diferentes peptídeos inibidores da ECA indica que a ligação à enzima é fortemente influenciada pela sequência do tripeptídeo C-terminal, o qual pode interagir com os subsítios S₁, S₁' e S₂' do sítio ativo da ECA (Li et al. 2004; Hayes et al. 2007b).

A ECA liga-se preferencialmente a substratos ou inibidores competitivos que contenham resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (aromáticos ou de cadeia ramificada) em cada uma das três posições C-terminais. Além disso, a presença de carga positiva da guanidina ou do grupo ε-amino da arginina e da lisina, ambos na posição C-terminal, também pode potencializar o efeito inibidor da ECA. Geralmente, aminoácidos básicos, aromáticos ou alifáticos são preferidos na penúltima posição, enquanto que resíduos de aromáticos e de alifáticos ou a prolina são requeridos na última posição (Hernández-Ledesma et al. 2004; Li et al. 2004; López-Fandiño e tal. 2006; Hayes et al. 2007b).

Considerando a relação estrutura do peptídeo e sua atividade inibitória, a escolha de enzima é um fator essencial na obtenção de hidrolisados proteicos com atividade anti-hipertensiva. Assim, enzimas que hidrolisam grupos carboxílicos de resíduos de aminoácidos aromáticos ou hidrofóbicos, bem como de lisina e arginina, podem ser mais adequadas para a liberação de peptídeos inibidores da ECA (López-Fandiño et al. 2006).

O fato de que o sítio catalítico da ECA possui diferentes requisitos conformacionais, indica que há a necessidade de desenvolver uma mistura complexa de peptídeos, de diferentes aspectos estruturais, de forma a inibir a ECA de forma mais intensa. Sugere-se, ainda, que o mecanismo de inibição da ECA também envolva a ligação a sítios que normalmente não são ocupados por substratos ou a um sítio aniônico de ligação do inibidor, que seja diferente do

centro catalítico da enzima (Li et al. 2004; López-Fandiño et al. 2006). Pelo exposto, percebe-se que, do ponto de vista comercial, a utilização de hidrolisados proteicos, que são compostos por peptídeos de diferentes massas moleculares e estruturas, pode ser útil na elaboração de produtos alimentícios ou suplementos nutricionais voltados para a dieta de indivíduos hipertensos (Wu; Ding 2002).

Ainda, é importante frisar que muitos peptídeos derivados de proteínas alimentares possuem atividade inibitória da ECA *in vitro* menor que a atividade do inibidor sintético captopril, mas eles usualmente mostram atividades *in vivo* em níveis bem superiores ao da ação *in vitro*. Este fato tem sido atribuído à maior afinidade destes peptídeos aos tecidos e a sua menor taxa de metabolização/eliminação, mas também é indicativo da existência de um modo de ação adicional, que não seja a inibição da ECA. Neste caso, acredita-se que os peptídeos sejam capazes de interagir com receptores opióides periféricos, estimulando a liberação de óxido nítrico, que causa vasodilatação (López-Fandiño et al. 2006; Erdmann et al. 2008).

2.6.2 Atividade inibitória da enzima conversora da angiotensina *in vitro*

A avaliação das propriedades inibitórias da ECA *in vitro* comumente é realizada por meio de ensaios que monitoram a concentração de produto formado a partir da adequada incubação/reação da ECA com seu substrato, na presença ou ausência de um inibidor, como por exemplo, um peptídeo ou hidrolisado proteico (Xiao et al. 2006).

Diversos métodos espectrofotométricos, fluorimétricos, radioquímicos, cromatográficos e eletroforéticos tem sido desenvolvidos para a determinação da atividade anti-ECA, sendo a atividade inibitória expressa em percentual ou como valor IC₅₀, correspondendo à quantidade de inibidor necessária para reduzir a atividade enzimática pela metade (López-Fandiño et al. 2006; Lahogue et al. 2010).

O método espectrofotométrico desenvolvido por Cushman; Cheung (1971) é o mais citado na literatura. Este procedimento é baseado na clivagem do substrato hipúril-histidil-leucina (HHL) pela ECA, com liberação do dipeptídeo histidil-leucina e do ácido hipúrico (AH), o qual é quantificado pela leitura em espectrofotômetro a 228 nm, depois de adequada extração com acetato de etila.

Embora este ensaio tenha sido usado por décadas, ele apresenta algumas limitações, tais como o tempo requerido para a extração do produto da mistura reacional e o uso de solventes orgânicos voláteis nesta análise. Outro inconveniente refere-se ao fato de que tanto

o substrato (HHL) quanto o produto (AH) apresentarem máximo de absorção a 228 nm, podendo superestimar a quantidade do produto formado (Vermeirssen et al. 2002; López-Fandiño et al. 2006; Lahogue et al. 2010).

Outra técnica espectrofotométrica amplamente utilizada é a descrita por Holmquist et al. (1979), na qual o tripeptídeo furanacrilóil-fenilalanilglicilglicina (FAPGG) é hidrolisado a furanacrilóil-fenilalanina (FAP) e no dipeptídeo glicilglicina (GG). Neste método, mensura-se a diminuição da absorbância do FAPGG (340 nm ou 345 nm), devido à hidrólise deste substrato pela ECA (25 °C por 5 minutos), com formação do produto furanoacrílico, o qual também pode ser quantificado pelo aumento da absorbância a 328 nm.

Porém, ambos os ensaios apresentam desempenho similar, todavia o substrato HHL em solução mostra-se menos estável que o FAPGG, e neste segundo ensaio, consome-se menor quantidade de reagente por amostra (Lahogue et al. 2010). Assim, vários autores aplicaram os princípios destes métodos espectrofotométricos às diferentes formas de cromatografia líquida (Wu et al. 2002; Hernández-Ledesma et al. 2004; Platerink et al. 2006; Shalaby et al. 2006; Xiao et al. 2006; Pegg et al. 2007; Lahogue et al. 2010), sendo que esta técnica tornou-se, atualmente, a mais utilizada para a determinação da atividade inibitória de peptídeos ou hidrolisados proteicos sobre a ECA.

Comumente, para a realização destas análises, o inibidor sintético captopril é empregado como controle positivo. Este composto apresenta um grupo sulfidrílico, capaz de quelar o íon zinco contido no sítio ativo da ECA, inativando-a (Vermeirssen et al. 2002).

Com relação especificamente às proteínas lácteas, vários estudos reportam a capacidade inibitória sobre a ECA e o efeito hipotensor de hidrolisados enzimáticos ou peptídeos obtidos a partir destas proteínas, conforme ilustrado na tabela 6. De forma geral, nestes estudos, os autores relatam que as condições hidrolíticas empregadas no preparo dos hidrolisados, bem como o mecanismo de ação das enzimas, foram fatores primordiais para a obtenção de peptídeos com elevada atividade inibitória da ECA.

Porém, de acordo com López-Fandiño et al. (2006), resultados de distintos trabalhos devem ser avaliados com cautela, devido ao uso de diferentes substratos ou, quando do mesmo teste, devido ao emprego de diferentes condições de teste ou ECA de distintas origens. Além disso, o nível de atividade enzimática deve ser cuidadosamente avaliado, para que se possam obter resultados reprodutíveis e comparáveis.

Tabela 6 – Atividade inibitória da enzima conversora de angiotensina de hidrolisados enzimáticos de proteínas lácteas.

Fonte proteica	Enzima	Avaliação da atividade inibitória		Referência
		Inibição (%)	IC ₅₀ (µg.mL ⁻¹)	
Caseína	Pepsina	--	22,3 a 60,9	Contreras et al. (2009)
	Pepsina	--	52,8	Miguel et al. (2009)
	Alcalase®, Flavourzyme™, Neutrase®, papaína, pepsina e tripsina	--	384,0 a 2115,0	Jiang et al. (2007)
Derivados de caseína	Pepsina, protease de <i>Bacillus licheniformis</i> , Proteinase K, Termolisina, tripsina	10,0 a 100,0%	--	Otte et al. (2007a)
WPI	Alcalase®, Neutrase®, tripsina	8,0 a 50,0%	--	Wang et al. (2010)
	Alcalase®, quimiotripsina, Proteomix	--	50,0 a 890,0	Costa et al. (2007)
	Pepsina, protease de <i>Bacillus licheniformis</i> , Proteinase K, Termolisina, tripsina	50,0 a 90,0%	--	Otte et al. (2007a)
WPC	Corolase PP®	--	160,0 a 840,0	Ven et al. (2002)
	Corolase PP®, elastase, pepsina, PTN 3.0 S, quimiotripsina, tripsina	35,5 a 88,6%	--	Mullally et al. (1997)
	Proteinases de <i>Lactobacillus helveticus</i> LB13	15,0 a 63%	--	Guo et al. (2009)
	Corolase PP® e papaína	17,3 a 91,9%	100,0 a 500,0	Silva (2010)
α-lactalbumina	Termolisina	97,2%	--	Otte et al. (2007b)
	Pepsina, protease de <i>Bacillus licheniformis</i> , Proteinase K, Termolisina, tripsina	60,0 a 100,0%	--	Otte et al. (2007a)
	Corolase PP®, elastase, pepsina, PTN 3.0 S, quimiotripsina, tripsina	56,8 a 87,1%	--	Mullally et al. (1997)
β-lactoglobulina	Pepsina, protease de <i>Bacillus licheniformis</i> , Proteinase K, Termolisina, tripsina	30,0 a 85,0%	--	Otte et al. (2007a)
	Corolase PP®, elastase, pepsina, PTN 3.0 S, quimiotripsina, tripsina	63,4 a 89,8%	--	Mullally et al. (1997)

2.6.3 Atividade anti-hipertensiva *in vivo*

Alguns estudos ainda relatam que muitos hidrolisados enzimáticos ou peptídeos, com atividade inibitória da ECA *in vitro*, também demonstram esta atividade ou efeitos anti-hipertensivos *in vivo* após a administração oral ou intravenosa em ratos espontaneamente hipertensivos (*spontaneously hypertensive rats – SHR*) e em ensaios clínicos com humanos. Em adição, em muitos trabalhos com peptídeos anti-hipertensivos verificou-se que os mesmos não afetam a pressão arterial de ratos Wistar-Kyoto (ratos WKY), que são considerados modelos de controle normotensos da HAS (López-Fandiño et al. 2006).

É importante frisar que em muitas vezes um peptídeo ou hidrolisado com elevada atividade inibitória da ECA *in vitro*, podem não exercer o mesmo efeito *in vivo*, uma vez que eles podem sofrer modificações fisiológicas, o que determina a biodisponibilidade destes inibidores e porque eles podem apresentar outros mecanismos de ação hipotensora distinto da inibição da ECA (López-Fandiño et al. 2006).

Todavia, antes de se proceder a um estudo *in vivo*, é imprescindível que os hidrolisados proteicos estejam bem caracterizados, especialmente quanto ao grau de hidrólise e ao perfil peptídico. Estas informações auxiliam o pesquisador na predição do valor nutricional destas preparações e, conseqüentemente, na avaliação de propriedades bioativas, representando, assim, uma alternativa para minimizar o uso de animais com fins científicos, em consonância com questões éticas e legais que envolvem a experimentação animal.

Mizuno et al. (2004) preparam hidrolisados de caseína, empregando diferentes enzimas (bromelaína de *Pineapple cannery*, papaína de *Carica papaya*, tripsina suína e proteases de *Aspergillus oryzae*, de *Bacillus subtilis*, de *Bacillus stearothermophilus*, de *Rhizopus nivenus*, de *Rhizopus delemar*), os quais foram administrados oralmente, por gavagem, a ratos SHR. Cinco horas após a administração dos hidrolisados (32 mg/quilo de peso), os autores observaram uma redução da pressão sistólica dos animais que receberam o hidrolisados quando comparados com o grupo controle, que recebeu a caseína intacta. Além disso, entre todas as amostras testadas, aquela obtida com a protease de *Aspergillus oryzae* foi a que promoveu a queda mais acentuada da pressão sistólica (25 mm Hg), sendo que este hidrolisado também foi o que apresentou a maior atividade inibitória da ECA *in vitro*. De acordo com estes autores (Mizuno et al. 2004), o alto percentual de resíduos de prolina identificados nestes hidrolisados pode ter sido responsável pela sua maior atividade anti-hipertensiva.

Miguel et al. (2009) verificaram que a administração oral de hidrolisados de caseína (400 mg/quilo de peso), em dose única, promoveu redução significativa da pressão sistólica e da diastólica de ratos SHR, quando comparados com o grupo controle, que recebeu apenas água destilada. Por outro lado, os autores também relatam que esta redução foi menos expressiva do que aquela produzida pela administração de captopril (50 mg/quilo de peso).

Com o objetivo de avaliar a resistência a enzimas digestórias de oito peptídeos identificados no leite fermentado por *Enterococcus faecalis* CECT 5727, Quirós et al. (2009) conduziram um processo de hidrólise em dois estágios (incubação com pepsina e Corolase PP®), simulando as condições fisiológicas *in vivo*. Os autores verificaram que, dos oito peptídeos testados, somente aquele derivado da β -caseína foi resistente à ação enzimática e manteve sua ação inibitória da ECA, fato este relacionado à presença de dois resíduos de prolina na estrutura deste peptídeo, tornando-o menos susceptível às enzimas proteolíticas.

O efeito anti-hipertensivo de hidrolisados de caseína, preparados com a protease neutra AS1.398, foi avaliado por Jiang et al. (2010), que aferiram a pressão sistólica de SHR, após a administração oral do hidrolisado em dose única (300 mg/quilo de peso). No grupo controle (sem hidrolisado), os pesquisadores não observaram nenhuma alteração da pressão sistólica, durante as 24 primeiras horas do ensaio. Em contrapartida, observaram uma queda da pressão nos ratos SHR, cinco horas após a administração em dose única do hidrolisado, sendo que dentro de 24 horas este efeito anti-hipertensivo já desaparecera. Todavia, os animais que continuaram recebendo doses diárias de hidrolisados, por período de quatro semanas, apresentavam menores valores de pressão sistólica, quando comparados com o grupo controle. Concluiu-se, portanto, que o efeito anti-hipertensivo dos hidrolisados era dose-dependente (Jiang et al. 2010).

Um estudo foi conduzido com pacientes de alta e média hipertensão, que ingeriam doses diárias de hidrolisados de caseína produzidos com a protease de *Aspergillus oryzae*, contendo os peptídeos IPP e VPP (Mizuno et al. 2005). Os voluntários que consumiam doses diárias de 1,8 mg de hidrolisado, exibiram significativa redução da pressão arterial após seis semanas, enquanto que aqueles que tomavam 2,5 ou 3,6 mg, apresentaram este mesmo efeito benéfico em apenas três semanas, quando comparados com o grupo controle placebo.

Verifica-se, portanto, que peptídeos ou hidrolisados proteicos com atividade inibitória da ECA e efeitos anti-hipertensivos podem ser aplicados como ingredientes funcionais em produtos alimentícios, sendo que alguns derivados lácteos já estão comercialmente disponíveis no mercado internacional, como os produtos da linha Evolus® (Valio Ltd,

Finlândia), o Ameal Peptide® (Calpis Corporation Ltda, Japão) e da linha Becel Pro-active® (Unilever, Inglaterra).

2.7 Peptídeos com atividade antioxidante

O estresse oxidativo instala-se nas situações em que ocorre um desequilíbrio entre os sistemas pró e antioxidante do organismo, com predomínio dos oxidantes (Barreiros et al. 2006; Vasconcelos et al. 2007). Este processo, em sua forma aguda ou crônica, tem sido relacionado ao processo de envelhecimento, transformação e morte celular, com consequências diretas em muitos processos patológicos, tais como em doenças degenerativas (cardiopatas, aterosclerose, diabetes, injúria isquêmica), inflamatórias (artrite reumatóide, colite ulcerativa e pancreatite), neurológicas (doença de Parkinson, esclerose lateral amiotrófica, síndrome de Down, doença de Alzheimer), oculares (degeneração macular relacionada ao envelhecimento e catarata) e pulmonares (asma e doença pulmonar obstrutiva crônica), a indução do câncer e a propagação de AIDS em pacientes soropositivos (HIV⁺) (Barreiro et al. 2006; Cerqueira et al. 2007; Vasconcelos et al. 2007).

Nos quadros de estresse oxidativo, o dano celular resulta basicamente do ataque dos radicais livres (RL) sobre as macromoléculas, especialmente carboidratos, DNA, proteínas e lipídeos. Entre as alterações mais drásticas encontram-se as que ocorrem na desoxirribose e bases nitrogenadas do DNA; ligações cruzadas entre bases nitrogenadas, DNA e proteínas e proteína-proteína; formação de adutos; peroxidação de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), que compõem membranas plasmáticas e lipoproteínas; e nitração e nitrosilação de proteínas (Cerqueira et al. 2007).

Os RL são definidos como qualquer átomo, molécula ou fragmento de molécula contendo um ou mais elétrons desemparelhados nas suas camadas de valência. Essa configuração faz com que sejam altamente instáveis e quimicamente muito reativos, comportando-se como doadores ou aceptores de elétrons e sejam capazes de existência independente em intervalos de tempos variáveis (Cerqueira et al. 2007; Valko et al. 2007; Lobo et al. 2010).

O elétron livre, que caracteriza um RL, pode estar centrado em um átomo de hidrogênio, oxigênio, nitrogênio, carbono, enxofre ou átomos de metais de transição. (Rover Júnior et al. 2001). Os RL, cujo elétron não pareado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio ou de nitrogênio, são denominados como espécies reativas de oxigênio (ERO) ou de nitrogênio (ERN), sendo as principais formas de RL encontrados na natureza. Os ERO

mais conhecidos são os radicais hidroxila (HO^\bullet), superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peroxila (ROO^\bullet) e alcóxila (RO^\bullet) e os compostos não-radicalares, como o oxigênio singlete, ozônio (O_3), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido hipocloroso (HOCl). Dentre as ERN incluem-se os radicais óxido nítrico ou monóxido de nitrogênio (NO^\bullet), dióxido de nitrogênio (NO_2^\bullet) e os compostos não-radicalares óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-), peroxinitritos (ONOO^-), cloreto de nitrila (NO_2Cl) e cloroaminas (Barreiro et al. 2006; Vasconcelos et al. 2007; Kunwar; Priyadarsini 2011).

Embora a presença de ERO e ERN tenha sido correlacionada com um grande número de doenças, estas espécies não têm um papel etiológico na grande maioria dos estados patológicos, mas participam diretamente dos mecanismos fisiopatológicos que determinam a continuidade e as complicações presentes nestes processos. Assim, o equilíbrio entre a formação e a remoção de espécies radicalares no organismo deve ser regulado de forma que as reações e processos metabólicos dependentes das mesmas possam ocorrer em um nível adequado para a manutenção da fisiologia das células (Rover Junior et al. 2001; Cerqueira et al. 2007).

Existem ainda as espécies derivadas de enxofre, o radical tífla (RS^\bullet), que é uma denominação genérica para um grupo de radicais com o elétron desemparelhado residindo no enxofre, formados quando um grupo tiol reage com uma espécie radicalar ou com metais de transição (Vasconcelos et al. 2007).

As ERO e as ERN são produtos do metabolismo humano, sendo sua produção observada em diversas condições fisiológicas. Estes compostos encontram-se envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular, controle da pressão arterial, apoptose, participação em mecanismos de reações inflamatórias, ação como segundo mensageiro e síntese de substâncias biológicas importantes (Barreiro et al. 2006; Vasconcelos et al. 2007; Kunwar; Priyadarsini 2011). Eles também são derivados de processos patológicos, exercícios físicos prolongados ou de fontes externas (exposição à radiação ionizante, ozônio, fumaça de cigarro, poluentes ambientais, produtos químicos). A formação de RL ocorre continuamente nas células como consequência de reações enzimáticas e não-enzimáticas (Rover Júnior et al. 2001; Lobo et al. 2010; Sarmadi; Ismail 2010; Kunwar; Priyadarsini 2011).

As células produzem RL pela ação de diversas enzimas (aldeído oxidase, lipo-oxigenase, flavina desidrogenase, ciclo-oxigenase, NADPH oxidase e sistema P450) (Rover Junior et al. 2001), pela auto-oxidação de pequenas moléculas (catecolaminas, flavinas e

hidroquinonas) ou, ainda, por meio dos sistemas carreadores de elétrons microsossomais e das membranas nucleares (Andrade Júnior et al. 2005).

Quando a produção de RL é exacerbada, o organismo dispõe de um eficiente sistema antioxidante que consegue controlar e reestabelecer o equilíbrio entre as espécies reativas formadas e inativadas (Cerqueira et al. 2007; Hayes et al. 2007b). As proteções conhecidas do organismo contra as ERO e as ERN abrangem a proteção enzimática ou por micromoléculas, que podem ter origem no próprio organismo ou serem adquiridas da dieta (Barreiros et al. 2006). As enzimas podem neutralizar ou eliminar radicais já formados, enquanto que as moléculas podem agir como sequestradores (“*scavenger*”) de radicais; doadores de prótons ou elétrons, supressores (“*quencher*”) de oxigênio singlete, sinergistas ou inibidores enzimáticos, e agentes quelantes de íons metálicos (Cerqueira et al. 2007; Lobo et al. 2010). Os antioxidantes ainda podem exercer seus efeitos em sistemas biológicos pela regulação da expressão gênica (Lobo et al. 2010).

O sistema enzimático é representado pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx) e glutaciona S-transferase (GST) (Barreiros et al. 2006; Vasconcelos et al. 2007). O sistema não enzimático é formado por muitas substâncias, que inclui antioxidantes endógenos (glutaciona, ubiquinona, ácido úrico, proteínas de transporte de metais de transição, bilirrubina etc) e da dieta (vitamina E, ácido ascórbico, carotenóides e flavonóides) (Barreiros et al. 2006; Cerqueira et al. 2007; Vasconcelos et al. 2007), além da haptoglobina, uma glicoproteína plasmática tetramérica (Valko et al. 2007).

Considerando que os componentes celulares não são totalmente protegidos por antioxidantes endógenos, e que antioxidantes obtidos da dieta são indispensáveis para minimizar os efeitos do estresse oxidativo, há crescente interesse em identificar outros compostos dos alimentos que também possam atuar como antioxidantes naturais e, neste sentido, muita atenção tem sido voltada para os peptídeos bioativos obtidos pela hidrólise enzimática de diferentes fontes proteicas, tais como leite (Phelan et al. 2009), soro de leite (Peña-Ramos; Xiong 2001; Peña-Ramos et al. 2004; Bayram et al. 2008; Dryáková et al. 2010; Peng et al. 2010; Sadat et al. 2011; Tavares et al. 2011; Corrons et al. 2012; Goudarzi et al. 2012), ovo (Xu et al. 2007), plasma (Wang et al. 2008; Liu et al. 2010), peixe (Ren et al. 2008; Nakajima et al. 2009; Barkia et al. 2010; Bougateg et al. 2010), alga (Sheih et al. 2009), trigo (Kong et al. 2008), soja (Park et al. 2010), arroz (Zhang et al. 2010) e milho (Li et al. 2008; Tang et al. 2010).

2.7.1 Mecanismos de ação antioxidante de peptídeos

A hidrólise das proteínas do soro de leite, seja por processo enzimático ou fermentativo, pode melhorar suas propriedades antioxidantes, em função da formação de peptídeos bioativos. Distintos mecanismos para explicar a capacidade antioxidante destes peptídeos incluem a inibição da peroxidação lipídica, o sequestro de radicais livres, a quelatação de íons metálicos de transição, a reação com oxigênio singlete e, provavelmente, a indução de genes responsáveis pela proteção celular contra os ERO (Erdmann et al. 2008; Sarmadi; Ismail 2010).

As propriedades antioxidantes dos hidrolisados proteicos estão relacionadas com a estrutura, composição e hidrofobicidade de seus peptídeos. De forma geral, eles contêm de 5 a 16 resíduos de aminoácidos, com massa molecular entre 500 e 1800 Da (Sarmadi; Ismail 2010; Samaranayaka; Chan 2011).

Com relação à composição aminoacídica, a presença de histidina e de aminoácidos hidrofóbicos na estrutura destes peptídeos também está relacionada ao potencial antioxidante. Adicionalmente, sabe-se que resíduos de aminoácidos aromáticos (Try e Trp) podem doar prótons para um radical deficiente de elétrons, tornando-se sequestradores de RL. Já, o grupo imidazol da histidina confere aos peptídeos a capacidade de doar prótons, de sequestrar radicais peroxila e a habilidade de quelar íons metálicos. Por outro lado, o grupo SH da cisteína pode reagir diretamente com os radicais livres e, ainda, favorecer a produção de glutathione, um potente antioxidante intracelular (Hayes et al. 2007a; Gómez-Ruiz et al. 2008; Hernández-Ledesma et al. 2008; Sarmadi; Ismail 2010; Samaranayaka; Chan 2011).

Em adição a presença de determinado aminoácido, sua correta posição na sequência peptídica também é importante, sendo que ele deve se localizar, preferencialmente, nas posições N- ou C-terminais dos peptídeos. Além disso, postula-se que a capacidade antioxidante é resultante do efeito integrado destas ações, mais do que a ação individual de um peptídeo (Sarmadi; Ismail 2010).

2.7.2 Atividade antioxidante de hidrolisados proteicos

Considerando-se as características desejáveis para que os peptídeos tenham função antioxidante, o uso de preparações contendo proteínas hidrolisadas do soro de leite, ricas em cisteína, vem sendo proposto como alternativa para a prevenção ou tratamento de diversas patologias, com já verificado em diversos estudos conduzidos em modelos animais (Hakkak

et al. 2000; McIntosh et al. 2001; Hakkak et al. 2001), nos quais o aumento da concentração sérica de glutathione resultou na inibição da formação/progressão de lesões pré-cancerígenas. Outros autores (Kent et al. 2003; Pacheco; Sgarbieri 2005; Pacheco et al. 2006), ao empregarem hidrolisados proteicos, ao invés da proteína intacta, na alimentação de ratos, também já demonstraram a elevação dos níveis plasmáticos da glutathione

Não foram encontrados relatos na literatura que abordassem o uso de hidrolisados proteicos, derivados de proteínas lácteas, com atividade antioxidante, em ensaios clínicos. Todavia, alguns estudos *in vitro* já foram realizados, sendo que em nenhum o WPC foi utilizado como fonte proteica. Assim, Peña-Ramos; Xiong (2001) hidrolisaram uma amostra de WPI com quatro enzimas puras (papaína, pepsina, tripsina e quimiotripsina) e três preparados comerciais (protease A de *Bacillus licheniformis*, protease P de *Bacillus sp.* e protease F de *Aspergillus oryzae*). Os hidrolisados obtidos foram então incubados com um sistema de lipossomas oxidável (50 mmol.L⁻¹ de FeCl₃ e 0,1 mmol.L⁻¹ de ascorbato), sendo a oxidação lipídica avaliada pelo método das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. Os pesquisadores verificaram que os hidrolisados de WPI preparados com as enzimas puras não inibiram a oxidação do sistema modelo, todavia, aqueles obtidos com as enzimas comerciais, especialmente a protease F, exibiram alta atividade antioxidante. De acordo com os autores, essa ação antioxidante estaria relacionada à capacidade de alguns peptídeos em quelar íons metálicos pró-oxidantes ou em reagir com os RL gerados durante a oxidação lipídica.

Em estudo com fibroblastos de pulmão, Kong et al. (2008) avaliaram o efeito de peptídeos antioxidantes (0,1 a 2,8 kDa) obtidos pela ação da Alcalase sobre as proteínas do soro de leite. Os autores verificaram que a incubação das células com os hidrolisados reduziu significativamente a morte celular induzida pela ação da H₂O₂. Este fato foi associado à maior atividade das enzimas antioxidantes celulares (superóxido dismutase, glutathione peroxidase e catalase) nestas amostras, quando comparadas com o grupo controle, o que, segundo os pesquisadores, demonstra a atividade antioxidante dos peptídeos e o efeito protetor que os mesmos exercem contra a toxicidade induzida pelo peróxido de hidrogênio.

Zhang et al. (2012) avaliaram o efeito protetor de hidrolisados de proteínas do soro (*whey protein hydrolysates* – WPH), obtidos pela ação da pepsina e da tripsina, contra a lesão oxidativa induzida por H₂O₂ em células da linhagem 12 de feocromocitoma de ratos (PC12). Para isso, estas células foram pré-tratadas com WPH em diferentes concentrações por duas horas, sendo então lavadas e incubadas com 100 µmol.L⁻¹ de H₂O₂ na presença de WPH, por mais 24 horas. Com 100 a 400 µg WPH.mL⁻¹, a viabilidade das células aumentou de 20 a

30% quando incubadas com H₂O₂, o que levou os autores a concluírem que os hidrolisados atuaram como importantes agentes antioxidantes.

2.7.3 Métodos para avaliação da atividade antioxidante

Os testes para a avaliação da capacidade antioxidante têm se tornado ferramentas usuais e extremamente necessárias na seleção inicial de substâncias que possam ser utilizadas como fármacos, auxiliando os pesquisadores na avaliação da atividade de substâncias isoladas de produtos naturais, bem como obtidas de fontes sintéticas. Além disso, estes métodos podem auxiliar na escolha de espécies de plantas para estudos químicos e farmacológicos, bem como grau de maturação, condições ambientais e etc, e comprovar a presença de substâncias antioxidantes em alimentos (Alves et al. 2010).

Devido aos diferentes tipos de RL e as suas diferentes formas de atuação nos organismos vivos, dificilmente existirá um método simples e universal pelo qual a capacidade antioxidante possa ser medida precisa e quantitativamente. Contudo, é importante ressaltar que a realização destes testes é necessária, tendo em vista que um composto de baixa capacidade antioxidante *in vitro* provavelmente exibirá pouca atividade *in vivo* (Alves et al. 2010; Samaranayaka; Chan 2011).

Diversas técnicas têm sido utilizadas para determinar a atividade antioxidante em alimentos e sistemas biológicos. Nos ensaios *in vitro*, comumente são realizadas reações químicas para avaliar a habilidade de um composto em inibir a formação ou em sequestrar radicais livres sintéticos ou orgânicos; a quantificação de produtos formados durante a peroxidação de lipídeos ou substratos lipoproteicos e a determinação eletroquímica de compostos oxidados (Alves et al. 2010; Marinova; Batchvarov 2011). Já nos ensaios *in vivo*, realiza-se a pesquisa de biomarcadores, que têm características passíveis de mensuração, como indicadores de processos biológicos normais, processos patogênicos ou de resposta farmacológica a uma intervenção terapêutica (Vasconcelos et al. 2007).

Com base em reações químicas, as técnicas *in vitro* para determinar a atividade antioxidante se dividem em ensaios baseados na transferência de átomos de hidrogênio (*hydrogen atom transfer* – HAT) ou na transferência simples de elétrons (*single electron transfer* – SET) (Prior et al. 2005; Sarmadi; Ismail 2010). De forma geral, em todas as técnicas, um radical é gerado e reage com moléculas-alvo, para produzir cor, fluorescência, quimioluminescência, perda ou ganho de sinais de ressonância do *spin* eletrônico ou outra

mudança mensurável. A presença de antioxidantes altera esses sinais, o que permite sua análise quantitativa (Vasconcelos et al. 2007).

Os principais métodos de mecanismo HAT podem se relacionar com o sequestro de radicais peroxila ($\text{ROO}\cdot$), como o TRAP (*Total Reactive Antioxidant Potentials or Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter*) e o ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) ou, ainda, em ensaios de descoloração de carotenóides (Huang et al. 2005; Prior et al. 2005). Este tipo de análise é baseado em estudos de cinética química, caracterizados pela competição entre um antioxidante (amostra ou padrão) e um substrato oxidável (sonda molecular), que deve apresentar um sinal mensurável (absorvância UV-visível ou fluorescência), pelos radicais gerados por uma fonte de radicais livres (azoiniciadores). Os ensaios HAT são independentes do pH e do tipo de solvente e, usualmente, de rápida execução. Porém, a presença de agentes redutores, como metais, pode interferir com a realização dos testes (Prior et al. 2005; Apak et al. 2008).

Com relação aos métodos baseados no mecanismo de SET, a atividade antioxidante é representada pela habilidade que determinada substância possui para reduzir o composto oxidante (sonda molecular) em um tempo predeterminado. A abstração de um elétron do antioxidante pela sonda promove alterações de cor, que podem ser acompanhadas espectrofotometricamente (Huang et al. 2005; Prior et al. 2005). Nestes ensaios não há reações competitivas envolvidas e nem são utilizadas espécies reativas de oxigênio e, desta maneira, assume-se que a capacidade antioxidante da amostra é equivalente a sua capacidade redutora (Huang et al. 2005).

Os principais ensaios SET podem se relacionar com a redução de íons metálicos, como o FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) e o CUPRAC (*Cupric Reducing Antioxidant Capacity ou Copper Reduction Assay*), ou com a redução de radicais orgânicos, como o TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) e o método do DPPH (2,2-difenil-1-picrila-hidrazila) (Apak et al. 2004; Huang et al. 2005; Prior et al. 2005; Vasconcelos et al. 2007; Apak et al. 2008; Sarmadi; Ismail 2010). Outro tipo de ensaio SET foi desenvolvido por Ozyurt et al. (2007), empregando o poder de redução de cério em meio ácido, que recebeu o nome de CeRAC (*Ceric ion Reducing Antioxidant Capacity*).

É importante destacar que embora as técnicas TEAC e DPPH sejam comumente classificadas com reações SET, já foi observado que a etapa limitante da reação dos radicais é uma rápida transferência de elétrons, sendo que a abstração de hidrogênio do antioxidante é uma reação secundária. Estes métodos, que envolvem um radical cromóforo, simulando as

espécies reativas de oxigênio, são os mais utilizados em virtude de sua praticidade, rapidez e sensibilidade (Huang et al. 2005; Prior et al. 2005).

O método do DPPH é um dos mais utilizados para a determinação da atividade antioxidante, em virtude de sua simplicidade, rapidez, acurácia, reprodutibilidade dos dados e a possibilidade de avaliar a atividade antioxidante independente da polaridade da amostra (Marinova; Batchvarov 2011), sendo, portanto, um dos métodos escolhidos para avaliar esta propriedade nos hidrolisados proteicos obtidos na presente pesquisa.

O DPPH é um radical de nitrogênio orgânico estável e comercialmente disponível (Sánchez-Moreno 2002; Huang et al. 2005). Esta metodologia baseia-se na redução do radical DPPH, de coloração violeta e com absorção máxima em etanol na faixa de 515 a 528 nm, por um composto antioxidante, com formação da hidrazina, de coloração amarela (Sánchez-Moreno 2002; Molyneux 2004; Alves et al. 2010). Nesta análise, os resultados podem ser expressos como a porcentagem de DPPH remanescente na solução, a qual seria proporcional à concentração de antioxidantes, ou em termos da concentração de antioxidante gasta para reduzir em 50% a concentração de DPPH (valor EC_{50}). Além disso, o tempo necessário para se atingir um estado estacionário, na EC_{50} , foi definido com T_{E50} , sendo estes dois parâmetros utilizados no cálculo da chamada eficiência antiradical (Huang et al. 2005; Prior et al. 2005; Marinova; Batchvarov 2011). A atividade antioxidante das amostras também pode ser calculada usando diferentes soluções padrão, tais como vitamina E, trolox, vitamina C e, mais raramente, butil-hidroxitolueno (BHT) ou butil-hidroxianisol (BHA) (Marinova; Batchvarov 2011).

Algumas desvantagens associadas a esta técnica são a interferência nos resultados caso o antioxidante analisado apresente espectro que se sobreponha ao do DPPH, como os carotenóides; a possibilidade de que os antioxidantes possam não reagir ou reagir lentamente com os radicais DPPH e, via de regra, esta reação não apresenta uma cinética linear; a maior reatividade do DPPH com moléculas pequenas, tendo em vista que estas apresentam melhor acessibilidade estérica ao sítio do radical e, aparentemente, apresentem maior atividade antioxidante quando comparada às moléculas maiores (Molyneux 2004; Huang et al. 2005; Prior et al. 2005; Alves et al. 2010). Além disso, o teste do DPPH não é uma análise válida para o plasma, tendo em vista a precipitação de proteínas no meio reacional alcoólico (Sánchez-Moreno 2002).

Além dos métodos químicos do tipo HAT e SET, citados anteriormente, existem outros ensaios para determinação da capacidade antioxidante relacionados com a habilidade dos diferentes compostos em sequestrar os diferentes tipos de ERO ou ERN, principalmente

das espécies consideradas biologicamente mais importantes, que são radicais superóxido, radicais hidroxila, ácido hipocloroso, peróxido de hidrogênio, oxigênio singlete e peroxinitritos (Sánchez-Moreno 2002; Huang et al. 2005; Alves et al. 2010; Sarmadi; Ismail 2010).

Assim, considerando que o radical $O_2^{\bullet-}$ é normalmente gerado por distintos sistemas enzimáticos do metabolismo humano, optou-se neste estudo em selecionar um método que permitisse avaliar a atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos de WPC frente a este radical livre.

Existem vários métodos que podem ser empregados nesta análise, entre eles a reação catalisada pela enzima hipoxantina-xantina oxidase, outestres não enzimáticos, como a reação de metassulfato de fenazina com NADH e oxigênio molecular. Assim, a capacidade antioxidante de diferentes compostos pode ser medida em termos da atividade seqüestradora deste radical ou através da inibição de sua formação pelo sistema hipoxantina-xantina oxidase (Sánchez-Moreno 2002; Alves 2010). Um terceiro tipo de análise de sequestro de radicais $O_2^{\bullet-}$ é o que combina a produção deste radical, a partir da excitação óptica de um fotossensibilizador, com a detecção de quimioluminescência do luminol. Porém, trata-se de um método que requer longos períodos de análise e necessita de equipamentos específicos (Prior et al. 2005).

O método da auto-oxidação do pirogalol também é outra técnica que nos permite avaliar a capacidade de sequestro de radicais $O_2^{\bullet-}$, tendo sido originalmente proposta por Marklund; Marklund (1974), para avaliar a ação da superóxido dismutase. Por ser considerado simples e rápido, foi a técnica selecionada na presente pesquisa, para avaliar a capacidade antioxidante dos hidrolisados proteicos de WPC.

Assim, a oxidação do pirogalol em meio alcalino torna a solução amarelo-esverdeada, com espectro de absorção entre 400 e 425 nm. Simultaneamente, a captura do oxigênio atmosférico pelo pirogalol resulta na formação e liberação de radicais superóxidos, os quais aceleram ainda mais seu processo de degradação (Marklund; Marklund 1974). Desta maneira, a inibição da oxidação do pirogalol ocorre na presença de um antioxidante, sendo a mudança da coloração medida em espectrofotômetro, em determinado intervalo de tempo. Comparando-se a taxa de oxidação de uma amostra em relação a uma mistura controle (pirogalol e água), pode-se estimar a capacidade de sequestro de radicais $O_2^{\bullet-}$ de um determinado composto.

Foram encontrados alguns estudos relativos ao uso deste método na avaliação da atividade antioxidante de hidrolisados de ovalbumina (Xu et al. 2007), de glúten de trigo

(Kong et al. 2008), de algodão (Gao et al. 2010), de milho (Tang et al. 2010) e de linhaça (Udenigwe; Aluko 2010), porém não há relatos do emprego desta técnica no estudo de hidrolisados proteicos de proteínas lácteas.

Outro tipo de RL normalmente produzido como resultado do metabolismo humano é o radical HO•, fato este que motivou a escolha de outra metodologia que permitisse avaliar a atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos de WPC frente a estes radicais.

Um dos métodos específicos pra determinar o sequestro do radical hidroxila é o ensaio da desoxirribose. Nesta análise, o radical HO• é gerado pela reação do cloreto férrico (FeCl₃) e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), na presença de ácido ascórbico, que reagem para formar Ferro(II)-EDTA juntamente com ascorbato oxidado. Então, adiciona-se H₂O₂, para formar Ferro(III)-EDTA e HO• através da reação de Fenton. Este radical degrada a 2-desoxirribose em diferentes produtos, alguns dos quais reagem com ácido tiobarbitúrico (ATB), sob aquecimento, e em pH baixo, formando compostos de coloração rosada, que podem ser monitorados por espectrofotometria a 532 nm. Assim, substâncias que tenham propriedades antioxidantes podem competir com a 2-desoxirribose pelo radical, produzindo uma diminuição na intensidade da coloração (Sánchez-Moreno et al. 2002; Alves et al. 2010).

Este teste é considerado um método simples e barato de medir a reatividade de algumas moléculas orgânicas (ex. ADP e ATP) frente ao radical HO•, porém algumas precauções devem ser observadas para se obter resultados satisfatórios: o antioxidante testado não deve reagir com o precursor do radical hidroxila (ex. H₂O₂), caso contrário não haverá formação do mesmo; a reação do antioxidante com o HO• não deve gerar produtos que apresentem coloração (Alves et al. 2010).

Além das técnicas mencionadas anteriormente, existem ainda as metodologias relacionadas com a quantificação de produtos formados durante a peroxidação lipídica. O produto da peroxidação lipídica reage com o ATB para formar substâncias que apresentam coloração rosada sob aquecimento, sendo acompanhada por espectrofotometria em 532 nm. A oxidação é inibida com a adição de um antioxidante, sendo acompanhada pela redução na absorvância. A formação da coloração é resultado de um complexo formado pelos produtos oxidados dos ácidos graxos insaturados com o ATB. Um dos maiores produtos formados desta degradação é o malondialdeído (MDA), embora outros produtos de oxidação, incluindo aldeídos α , β insaturados e vários precursores não voláteis destas substâncias possam também estar envolvidos (Alves et al. 2010).

Distintas técnicas eletroquímicas também podem ser empregadas na avaliação da atividade antioxidante de substâncias. Dentre elas, encontram-se as voltamétricas (voltametria

cíclica – VC; voltametria de pulso diferencial - VPD), que podem correlacionar potenciais de oxidação, intensidade de corrente e/ou outros parâmetros eletroquímicos com a capacidade antioxidante, e as coulométricas, que se baseiam na medida da quantidade de eletricidade ou carga requerida para oxidar ou reduzir um analito alvo (Alves et al. 2010).

Outro procedimento eletroanalítico simples é o CRAC (*Ceric Reducing Antioxidant Capacity*), proposto por Ferreira; Avaca (2008), que emprega a cronoamperometria como técnica de detecção e utiliza uma solução ácida de sulfato de cério (IV) como oxidante. Este método tem como vantagens ser uma técnica simples, empregar equipamentos baratos, dispensar um rigoroso pré-tratamento da amostra, e o fato de que o cério(IV) ser um poderoso oxidante, que reage praticamente com todos os antioxidantes presentes na dieta humana (Ferreira; Avaca 2008).

Embora existam diversos métodos para se avaliar a atividade antioxidante, nenhum deles pode ser usado como um método oficial e, sugere-se que cada avaliação seja feita por vários métodos em diferentes condições de reação (Sarmadi; Ismail 2010). Além disso, é preciso destacar que muitas dessas análises se baseiam estritamente em reações químicas *in vitro* e não têm qualquer similaridade com sistemas biológicos. Assim, a validade de seus dados limita-se a um contexto de interpretação estritamente químico e o uso de tais testes para determinar a bioatividade de uma amostra biológica deve ser visto com cautela, uma vez que eles não medem biodisponibilidade, estabilidade *in vivo*, retenção de antioxidantes pelos tecidos, nem reatividade *in situ* (Vasconcelos et al. 2007). Por outro lado, estes testes são ferramentas indispensáveis para estudos clínicos, quando combinados com ensaios de amostras biológicas que avaliam os biomarcadores de estresse oxidativo (Huang et al. 2005).

Para a determinação da atividade antioxidante em amostras biológicas, como o sangue, por exemplo, pode-se pesquisar a concentração das principais enzimas antioxidantes, da glutathione e de antioxidantes não enzimáticos, bem como marcadores de danos oxidativos (Rover Junior et al. 2001; Vasconcelos et al. 2007; Sarmadi; Ismail 2010). Estes ensaios são úteis para monitorar as mudanças *in vivo* induzidas pelo estresse oxidativo, bem como para investigar a eficiência de antioxidantes da dieta (Sarmadi; Ismail 2010).

Com relação a outros antioxidantes endógenos (ubiquinona, α -tocoferol, vitamina C, β -caroteno), comumente a CLAE é o método de escolha para analisar a concentração destas substâncias em amostras de plasma ou soro. A identificação de diversos marcadores de dano oxidativo, resultantes da reação das macromoléculas com ERO e ERN, em amostras de sangue ou outros fluidos biológicos, também é outra maneira de se avaliar a eficiência de compostos antioxidantes. Estes ensaios comumente envolvem a detecção espectrofotométrica

de grupos carbonilas de proteínas oxidadas; a detecção cromatográfica de produtos de oxidação lipídica, como o malonaldeído, e de nitração proteica, como a 3-nitrotirosina; a detecção de 8-oxo-2'-desoxiguanosina em linfócitos por CLAE, avaliar a oxidação de bases do DNA, bem como a realização de teste do cometa em leucócitos, para determinar a quebra da molécula de DNA (Vasconcelos et al. 2007).

2.8 REFERÊNCIAS

- AB Enzymes. Corolase®PP, Corolase®7089, Corolase®LAP, Corolase®N: description and specification. Darmstadt: AB Enzymes; 2001. (Technical Report n. 2).
- Abubakar A, Saito T, Kitazawa H, Kawai Y, Itoh T. Structural analysis of new antihypertensive peptides derived from cheese whey protein by proteinase K digestion. *J Dairy Sci* 1998; 81(12): 3131-8.
- Adibi SA, Morse EL. Intestinal transport of dipeptide in man: relative importance of hydrolysis and intact absorption. *J Clin Invest* 1971; 50(11): 2266-75.
- Adibi SA, Soleimanpour MR. Functional characterization of dipeptide transport system in human jejunum. *J Clin Invest* 1974; 53(5):1368-74.
- Adler-Nissen J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *J Agric Food Chem* 1979; 27(6): 1256-61.
- Adler-Nissen J. Enzymic hydrolysis of food proteins. London: Elsevier Applied Science, 1986. 426p.
- Agin D, Gallagher D, Wang J, Heymsfield SB, Pierson RN, Kotler DP. Effects of whey protein and resistance exercise on body cell mass, muscle strength, and quality of life in women with HIV. *AIDS* 2001; 15(8): 2431-40.
- Agin D, Kotler DP, Papandreou D, Liss M, Wang J, Thornton J, Gallagher D, Pierson RN Jr. Effects of whey protein and resistance exercise on body composition and muscle strength in women with HIV infection. *Ann NY Acad Sci* 2000; 904: 607-9.
- Almaas H, Holm H, Langsrud T, Flengsrud R, Vegarud GE. *In vitro* studies of the digestion of caprine whey proteins by human gastric and duodenal juice and the effects on selected microorganisms. *British J Nut* 2006; 96: 562-9.
- Alpert AJ. Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *J Chromat* 1990; 499(2): 177-96.
- Alves CQ, David JM, David JP, Bahia MV, Aguiar RM. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. *Quim Nova* 2010; 33(10): 2202-2210.
- Amarowicz R, Zdunczyk P, Flaczyk E. Capillary zone electrophoresis separation of hydrolysates obtained from food industry by-products. *Czech J Food Sci* 2004; 22(3): 121-4.
- Amiza MA, Kong YL, Faazaz AL. Effects of degree of hydrolysis on physicochemical properties of cobia (*Rachycentron canadum*) frame hydrolysate. *Int Food Res J* 2012; 19(1): 199-206.
- Andrade Júnior DR, Souza RB, Santos SA, Andrade DR. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. *J Bras Pneumol*. 2005; 31(1): 60-68.
- Anema SG. The use of ‘‘lab-on-a-chip’’ microfluidic SDS electrophoresis technology for the separation and quantification of milk proteins. *Int Dairy Journal* 2009; 19(4): 198-204.

Apak R, Güçlü K, Özyürek M, Çelik SE. Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay. *Microchim Acta* 2008; 160: 413-419.

Apak R, Güçlü K, Özyürek M, Karademir SE. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *J Agric Food Chem* 2004; 52(26):7970-7981.

Araújo FL, Monteiro LZ, Pinheiro MHNP, Silva CAB. Prevalência de fatores de risco para hipertensão arterial em escolares do município de Fortaleza, CE. *Rev Bras Hipertens* 2010; 17(4): 203-9.

Attaallah W, Yılmaz AM, Erdoğan N, Yalçın AS, Aktan AO. Whey protein versus whey protein hydrolysate for the protection of azoxymethane and dextran sodium sulfate induced colonic tumors in rats. *Pathol Oncol Res* 2012; 18(4):817-22.

Autenrieth W, Mink F. Colorimetric determinations: the quantitative determination of albumin in urine. *Munch med Wochschr* 1915; 82: 1417-20.

Autenrieth W. Colorimetric estimation of serum albumin and globulin in urine, ascitic fluid and blood serum. *Munch med Wochschr.* 1917; 64: 24-5.

Baek HH, Cadwallader KR. Enzymatic hydrolysis of crayfish processing by-products. *J Food Sci* 1995; 60(5): 929-35.

Barbosa AS, Florentino ER, Florêncio IM, Araújo AS. Utilização do soro como substrato para produção de aguardente: estudo cinético da produção de etanol. *Rev Verde Agroecol Desenv Sustent* 2010; 5(1): 7-25.

Barkia A, Bougatef A, Haled HB, Nasri M. Antioxidant activities of sardinelle heads and/or viscera protein hydrolysates prepared by enzymatic treatment. *J Food Biochem* 2010; 34: 303-20.

Barreiros ALBS, David JM, David JP. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quim Nova* 2006; 29(1): 113-123.

Barros RM, Extremina CI, Gonçalves IC, Braga BO, Balcao VM, Malcata FX. Hydrolysis of α -lactalbumin by cardosin A immobilized on highly activated supports. *Enzyme Microb Technol* 2003; 33(7): 908-16.

Baruchel S, Viaux G. *In vitro* selective modulation of cellular glutathione by a humanized native milk protein isolate in mammal cells and rat mammary carcinoma model. *Anticancer Res* 1996; 15: 1095-100.

Batista I, Ramos C, Coutinho J., Bandarra NM, Nunes ML. Characterization of protein hydrolysates and lipids obtained from black scabbardfish (*Aphanopus carbo*) by-products and antioxidative activity of the hydrolysates produced. *Process Biochem* 2010; 45: 18-24.

Bayram T, Pekmez M, Arda N, Yalçın S. Antioxidant activity of whey protein fractions isolated by gel exclusion chromatography and protease treatment. *Talanta* 2008; 75: 705-9.

Benítez R, Ibarz A, Pagan J. Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. *Acta Bioquím Clin Latinoam* 2008; 42(2):227-36.

Berg A, Filipiak-Pittroff B, Krämer U, Link E, Bollrath C, Brockow I, Koletzko S, Grübl A, Heinrich J, Wichmann HE, Bauer CP, Reinhardt D, Berdel D. Preventive effect of hydrolyzed infant formulas persists until age 6 years: long-term results from the German Infant Nutritional Intervention Study(GINI). *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121(6): 1442-47.

Berg A, Koletzko S, Laubereau B, Grübl A, Wichmann HE, Bauer CP, Reinhardt D, Berdel D. Certain hydrolyzed formulas reduce the incidence of atopic dermatitis but not that of asthma: three-year results of the German Infant Nutritional Intervention Study. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119(3): 718-25.

Bergman T, Agerberth B, Jörnval H. Direct analysis of peptides and amino acid from capillary electrophoresis. *FEBS Letter* 1991; 283(1): 100-3.

Beszédes S, László Z, Szabó G, Hodúr C. The possibilities of bioenergy production from whey. *J Agric Sci Technol* 2010; 4(1): 62-8.

Beynon R, Bond JS. *Proteolytic enzymes*. 2. ed. Oxford: Oxford University Press, 2001.

Bezault J, Bhimani R, Wiprovnick J, Furmanski P. Human lactoferrin inhibits growth of solid tumors and developmental metastasis in mice. *Cancer Res* 1994; 54(9): 2310-2.

Bizzotto CS, Capobianco M, Biasutti EAR, Silva VDM, Junqueira RG, Silvestre, MPC. Hidrolisados proteicos de arroz com baixo teor de fenilalanina, obtidos pela ação da Corolase PP e uso do carvão ativado. *Cienc Agrotec*. 2006; 30(2): 308-16.

Blazek V. Chemical and biochemical factors that influence the gelation of soybean protein and the yield of tofu. Sidney. Tese [PhD] - Faculty of Agriculture, Food and Natural Resources of the University of Sydney; 2008.

Bonang G, Monintja HE, Sujudi WD, van der Waaij D. Influence of breastmilk on the development of resistance to intestinal colonization in infants born at the Atma Jaya Hospital, Jakarta. *Scand J Infect Dis* 2000; 32(2): 189-96.

Bosselaers IEM, Caessens PWJ, van Bokel MAJ, Alink GM. Differential effects of milk proteins, BSA and soy protein on 4NQQ- or MNNG-induced SCEs in V79 cells. *Food Chem Toxicol* 1994; 32: 905-9.

Bougatef A, Hajji M, Balti R, Lassoued I, Triki-Ellouz Y, Nasri M. Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chem* 2009; 114: 1198-205.

Bougatef A, Nedjar-Arroume N, Manni L, Ravallec R, Barkia A, Guillochon D, Nasri M. Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products proteins. *Food Chem* 2010; 118: 559-65.

Bounous G, Brauchel S, Falutz J, Gold P. Whey proteins as a food supplement in HIV-seropositive individuals. *Clin Invest Med* 1993; 16(3): 204-9.

Bounous G, Papenburg R, Kongshavn PAL, Gold P, Fleiszer D. Dietary whey protein inhibits the development of dimethylhydrazine induced malignancy. *Clin Invest Med* 1988; 11(3): 213-17.

Boza JJ, Moënnoz D, Vuichoud J, Jarret AR, Gaudard-de-Weck D, Ballèvre O. Protein hydrolysate vs free amino acid-based diets on the nutritional recovery of the starved rat. *Eur J Nut* 2000; 39(6): 237-43.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-54.

Brans G, Schroën CGPH, Sman RGM, Boom RM. Membrane fractionation of milk: state of the art and challenges. *J Memb Sci* 2004; 243(1-2):263-72.

Briczinski EP, Roberts RF. Production of an exopolysaccharide-containing whey protein concentrate by fermentation of whey. *J Dairy Sci* 2002; 85: 3189-97.

Brisson G, Britten M, Pouliot Y. Effect of iron saturation on the recovery of lactoferrin in rennet whey coming from heat-treated skim milk. *J Dairy Sci* 2007; 90(6): 2655-64.

Bröer S. Amino acid transport across mammalian intestinal and renal epithelial. *Physiol Rev* 2008a; 88(1): 249-86.

Bröer S. Apical transporters for neutral amino acids: physiology and pathophysiology. *Physiology* 2008b; 23:95-103.

Brodin B, Nielsen CU, Steffansen B, Frøkjær S. Transport of peptidomimetic drugs by the intestinal di/tri-peptide transporter, PepT1. *Pharm Toxicol* 2002; 90(6): 285-96.

Buckley JD, Thomson RL, Coates AM, Howe PRC, Denichilo MO, Rowney MK. Supplementation with a whey protein hydrolysate enhances recovery of muscle force-generating capacity following eccentric exercise. *J Sci Med Sports* 2010; 13(1):178-81.

Burke DG, Chilibeck PD, Davidson KS, Candow DG, Farthing J, Smith-Palmer T. The effect of whey protein supplementation with and without creatine monohydrate combined with resistance training on lean tissue mass and muscle strength. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 2001; 11(3): 349-64.

Cabrera-Padilla RY, Pinto GA, Giordano RLC, Giordano RC. A new conception of enzymatic membrane reactor for the production of whey hydrolysates with low contents of phenylalanine. *Process Biochem* 2009; 44(3): 269-76.

Cao W, Zhang C, Hong P, Ji H. Optimising the free radical scavenging activity of shrimp protein hydrolysate produced with alcalase using response surface methodology. *Int J Food Sci Technol* 2009; 44(8):1602-8.

Capobiango M, Silva VDM, Machado, MAV, Coelho, JV, Segall, SD, Silvestre, MPC. Ação da Corolase PP e uso do carvão ativado na obtenção de hidrolisados proteicos de fubá de milho com baixo teor de fenilalanina. *Rev Bras Nutr Clin* 2006; 21(4): 259-66.

Carrasco CA, Guerra, M. Lactosuero como fuente de peptídeos bioactivos. *An Venez Nutr* 2010; 23(1): 42-9.

Carreira RL, Barbosa CMS, Junqueira RG, Motta S, Silvestre MPC. Emprego da cromatografia líquida de alta eficiência hidrofílica na determinação dos aminoácidos em hidrolisados de caseína. *Cien Tecnol Alim* 2002; 22(3): 229-32.

Carreira RL, De Marco LM, Dias DR, Morais HA, Silvestre, MPC. Analysis of peptide profiles of casein hydrolysates prepared with pepsin, trypsin and subtilisin. *Lat. Am. J. Pharm.* 2004; 23 (1): 17-25.

Carreira RL, Ornellas CBD, Morais HA, Motta S, Silvestre MPC. Efeito da precipitação pelo ácido tricloroacético (TCA) e da ultrafiltração sobre o perfil peptídico de hidrolisados de caseína. *Cienc Agrotecnol* 2003; 27(2): 414-21.

Carreira RL, Ramos CS, Vasconcelos AB, Santoro MM, Silvestre, MPC. Efeito de parâmetros hidrolíticos na obtenção de hidrolisados proteicos de farinha de trigo com baixo teor de fenilalanina. *Cienc Tecnol Aliment* 2010; 30(1): 152-7.

Carreira RL, Silva VDM, Lima LG, Morais HA, Silvestre MPC. Peptide profile of protein hydrolysates from wheat flour. *Pesq Agropec Trop* 2011; 41(4): 481-9.

Castro GA, Maria DA, Bouhallab S, Sgarbieri VC. *In vitro* impact of a whey protein isolate (WPI) and collagen hydrolysates (CHs) on B16F10 melanoma cells proliferation. *J Dermatol Sci* 2009; 56(1): 51-7.

Catiau L, Delval-Dubois V, Guillochon D, Nedjar-Arroume N. Characterization and identification of a chymotryptic hydrolysate of alpha-lactalbumin stimulating cholecystokinin release in STC-1 cells. *Applied Biochem Biotech* 2011; 165(5-6): 1264-73.

Celus I, Brijs K, Delcour JA. Fractionation and characterization of brewers' spent grain protein hydrolysates. *J Food Agric Chem* 2009; 57: 5563-70.

Centenaro GS, Sallas-Melado M. Influência das concentrações de enzima e de substrato no grau de hidrólise e no conteúdo protéico de hidrolisados enzimáticos de corvina (*Micropogonias furnieri*). *Bol Centro Pesq Proc Alim* 2008; 26(1): 61-70.

Centenaro GS, Prentice-Hernández C, Sallas-Mellado M. Efeito da concentração de enzima e de substrato no grau de hidrólise nas propriedades funcionais de hidrolisados proteicos de corvina (*Micropogonias furnieri*). *Quim Nova* 2009; 32(7): 1792-8.

Cerqueira FM, Medeiros MHG, Augusto O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. *Quim Nova* 2007; 30(2): 441-449.

Chanput W, Theerakulkait C, Nakai S. Antioxidative properties of partially purified barley hordein, rice bran protein fractions and their hydrolysates. *J Cereal Sci* 2009; 49: 422-8.

Chatterton DEW, Smithers G, Roupas P, Brodkorb A. Bioactivity of β -lactoglobulin and α -lactalbumin: technological implications for processing. *Int Dairy J* 2006; 16(11): 1229-40.

Cheison SC, Schmitt M, Leeb E, Letzel T, Kulozik U. Influence of temperature and degree of hydrolysis on the peptide composition of trypsin hydrolysates of β -lactoglobulin: analysis by LC-ESI-TOF/MS. *Food Chem* 2010; 121(2): 457-67.

Cheison SC, Zhang SB, Wang Z, Xu SY. Comparison of a modified spectrophotometric and the pH-stat methods for determination of the degree of hydrolysis of whey proteins hydrolysed in a tangential-flow filter membrane reactor. *Food Res Int* 2009; 42(1): 91-7.

Chel-Guerrero L, Domínguez-Magaña M, Martínez-Ayala A, Dávila-Ortiz G, Betancur-Ancona D. Lima bean (*Phaseolus lunatus*) protein hydrolysates with ACE-I inhibitory activity. *Food Nut Sci* 2012; 3: 511-21.

Chen YC, Chang HS, Wang CT, Cheng FY. Antioxidative activities of hydrolysates from duck egg white using enzymatic hydrolysis. *Asian-Aust J Anim Sci* 2009; 22(11): 1587-93.

Chicón R, Belloque J, Alonso E, López-Fandiño R. Antibody binding and functional properties of whey protein hydrolysates obtained under high pressure. *Food Hydrocoll* 2009; 23(3): 593-9.

Chmiel JF. Anti-tumor effects of dietary whey protein and its value for head and neck cancer patients. In: *Proceedings of the second International Whey Conference; 1997 oct 27-29; Chicago, USA. Chicago: International Dairy Federation; 1998. p. 310-4.*

Choi YJ, Hurs, Choi BD, Konno K, Park JW. Enzymatic hydrolysis of recovered protein from frozen small croaker and functional properties of its hydrolysates. *J Food Sci* 2009; 74: 17-24.

Choi YS, Ikeda I, Sugano M. The combined effects of dietary proteins and fish oil on cholesterol metabolism in rats of different ages. *Lipids* 1989; 24(6): 506-10.

Church FC, Porter DH, Catignani GL, Swaisgood HE. An o-phthalaldehyde spectrophotometric assay for proteinases. *Anal Biochem* 1985; 146(2): 343-8.

Church FC, Swaisgood HE, Porter DH, Catignani GH. Spectrophotometric assay using o-phthalaldehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *J Dairy Sci* 1983; 66(6): 1219-27.

Clemente A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends Food Sci Technol* 2000; 11(7): 254-62.

Contreras MM, Carro R, Montero MJ, Ramos M, Recio I. Novel casein-derived peptides with antihypertensive activity. *Int Dairy J* 2009; 19: 566-73.

Contreras MM, Hernández-Ledesma B, Amigo L, Martín-Álvarez PJ, Recio I. Production of antioxidant hydrolysates from a whey protein concentrate with thermolysin: optimization by response surface methodology. *LWT – Food Sci Technol* 2011; 44(1): 9-15.

Corrons MA, Bertucci JI, Liggieri CS, López LMI, Bruno MA. Milk clotting activity and production of bioactive peptides from whey using *Maclura pomifera* proteases. *LWT-Food Sci Technol* 2012; 47: 103-9.

Costa EL, Gontijo JAR, Netto FM. Effect of heat and enzymatic treatment on the antihypertensive activity of whey protein hydrolysates. *Int Dairy J* 2007; 117: 632-40.

Costa JV, Silva ARV, Moura IH, Carvalho RBN, Bernardes LE, Almeida PC. Análise de fatores de risco para hipertensão arterial em adolescentes escolares. *Rev Latino-Am Enfermagem* 2010; 20(2): 1-7.

Costa RG, Beltrão Filho EM, Medeiros GR, Villarroel ABS, Santa Cruz SESB, Santos EM. Substituição do leite de cabra por soro de queijo bovino para cabritos alpinos. *R Bras Zootec* 2010; 39(4):824-30.

Cribb PJ, Williams AD, Stathis CG, Carey MF, Hayes, A. Effects of whey isolate, creatine, and resistance training on muscle hypertrophy. *Med Sci Sports Exer* 2007; 39(2): 298-307.

Cushman DW, Cheung H. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin converting enzyme of rabbit lung. *Biochem Pharmacol* 1971; 20(7): 1637-48.

Daguer H, Assis MTQM, Bersot LS. Controle da utilização de ingredientes não cárneos para injeção e marinação de carnes. *Cien Rural* 2010; 40(9): 2037-46.

Dai F, Burkert VP, Singh HN, Hinze WL. Update and evaluation of the effectiveness of different thiols and micellar media in Roth's fluorimetric method for the determination of primary amino compounds. *Microchem J* 1997; 57: 166-98.

Daniel H. Molecular and integrative physiology of intestinal peptide transport. *Annu Rev Physiol* 2004; 66:341-84.

Daniel H, Rubio LA. An update on renal peptide transporters. *Am J Physiol - Renal* 2003; 284(5): 885-92.

David FM, Collao-Saen EA, Pérez JRO, Castro ALA, Resende HRA, Landim AV. Efeito da adição de soro de leite sobre a digestibilidade aparente e os parâmetros sanguíneos de vacas secas. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2010; 62(5):1183-90.

De Marco LM, Delvivo FM, Silva VDM, Coelho JV, Silvestre MPC. Uso de carvão ativado para remoção de fenilalanina de hidrolisados obtidos da papaína imobilizada. *Braz J Food Technol* 2005; 8(3): 210-9.

Delvivo FM, Vieira CR, Biasutti EAR, Capobianco M, Silva VDM, Afonso WO, Silvestre MPC. Effect of adsorption medium, hydrolytic parameters and ultrafiltration on the phenylalanine removal from pancreatic whey hydrolysates. *Am J Food Technol* 2006; 1(2): 94-104.

Denis A, Brambati N, Dessauvages B, Guedj S, Ridoux C, Meffre N, Autier C. Molecular weight determination of hydrolyzed collagens. *Food Hydrocolloids* 2008; 22(6): 989-94.

Dias NFGP, Sgarbieri VC, Jacobucci HB, Rangel HA, Tanikawa C. Dietary protein, immune function and colon carcinogenesis in mouse. *Lait* 2006; 86(3): 11-4.

Dong XP, Zhu BW, Zhao HX, Zhou DY, Wu HT, Yang JF, Li DM, Murata Y. Preparation and in vitro antioxidant activity of enzymatic hydrolysates from oyster (*Crassostrea talienwhannensis*) meat. *Int J Food Sci Technol* 2010; 45: 978-84.

Doucet D, Gauthier SF, Foegeding EA. Rheological characterization of a gel formed during extensive enzymatic hydrolysis. *J Food Sci* 2001; 66(5): 711-5.

Doucet D, Otter DE, Gauthier SF, Foegeding EA. Enzyme-induced gelation of extensively hydrolyzed whey proteins by Alcalase: peptide identification and determination of enzyme specificity. *J Agric Food Chem* 2003; 51(21): 6300-8.

Drago SR, González RJ. Foaming properties of enzymatically hydrolysed wheat gluten. *Innov Food Sci Emer Technol* 2001; 1: 269-73.

Dryáková A, Pihlanto A, Marnila P, Čurda L, Korhonen HJT. Antioxidant properties of whey protein hydrolysates as measured by three methods. *Eur Food Res Technol* 2010; 230: 865–874.

Dziuba M, Darewicz M. Food proteins as precursors of bioactive peptides: classification into families. *Food Sci Technol Int* 2007; 13(6): 393-404.

Dzwolak W, Ziajka S. Enzymatic hydrolysis of milk proteins under alkaline and acidic conditions. *J Food Sci* 1999; 64(3): 393-5.

Erdmann K, Cheung BWY, Schröder H. The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. *J Nutr Biochem* 2008; 19(10): 643-54.

Etzel MR. Manufacture and use of dairy protein fractions. *J Nut* 2004; 134(Suppl): 996-1002.

Farvin KH, Baron CP, Nielsen SN, Otte J, Jacobsen C. Antioxidant activity of yoghurt peptides: part 2-characterisation of peptide fractions. *Food Chem* 2010; 123(4): 1090-7.

Ferreira ACB, Fonseca LM, Santos WLM. Composição centesimal e aceitação de linguiça elaborada com reduzido teor de gordura e adicionada de concentrados proteicos de soro de leite. *Cienc Rural* 2009; 39(1):209-14.

Ferreira LO, Pimenta CJ, Santos G, Ramos TM, Pereira PAP, Pinheiro ACM. Adição de soro de leite e café na qualidade do doce de leite pastoso. *Cienc Rural* 2012; 42(7): 1314-19.

Ferreira RQ, Avaca LA. Determinação eletroquímica da capacidade antioxidante de sucos de frutas industrializados usando o CRAC assay. *Quim Nova* 2008; 31(8): 2169-2173.

Fields R. The measurement of amino groups in proteins and peptides. *Biochem J* 1971; 124(3): 581-90.

Fine J. The biuret method of estimating albumin and globulin in serum and urine. *Biochem J* 1935; 29(3): 799-803.

Fischer W. Human α -lactalbumin made lethal to tumor cells, kills human glioblastoma cells in brain xenografts by an apoptosis -like mechanism. *Cancer Res* 2004; 64(6): 2105-12.

Fitzgerald RJ, O’Cuinn G. Enzymatic debittering of food protein hydrolysates. *Biotechnol Adv* 2006; 24(2):234-7.

Folin O, Ciocalteu V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *J Biol Chem* 1927; 73: 627-50.

Fraenkel-Conrat H, Olcott HS. The reaction of formaldehyde with proteins *versus* cross-linking between amino and primary amide or guanidyl groups. *J Am Chem Soc* 1948; 70(8): 2673-84.

Friedman M. Applications of the ninhydrin reaction for analysis of amino acids, peptides, and proteins to agricultural and biomedical sciences. *J Agric Food Chem* 2004; 52(3): 385-406.

Gajo AA, Carvalho MS, Abreul R, Pinto SM. Avaliação da composição química e características sensoriais de bebidas lácteas fermentadas elaboradas com leite de ovelha. *Rev Inst Latic Cândido Tostes* 2010; 65(374): 59-65.

Gallagher J, Kanekanian AD, Evans P. Hydrolysis of casein: a comparative study of two proteases and their peptide maps. *Int J Food Sci Technol* 1994; 29: 279-85.

Gao D, Cao Y, Li H. Antioxidant activity of peptide fractions derived from cottonseed protein hydrolysate. *J Sci Food Agric* 2010; 90:1855-60.

Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, Ivanyi I, Appel RD, Bairoch A. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res* 2003; 31(13): 3784-88.

Gilbert ER, Wong EA, Webb Jr KE. Peptide absorption and utilization: implications for animal nutrition and health. *J Animal Sci* 2008; 86(9): 1493-501.

Gómez-Ruiz JA, López-Expósito I, Pihlanto A, Ramos M, Recio I. Antioxidant activity of ovine casein hydrolysates: identification of active peptides by HPLC–MS/MS. *Eur Food Res Technol* 2008; 227:1061-7.

González-Tello P, Camacho F, Jurado E, Páez MP, Guadix EM. Enzymatic hydrolysis of whey proteins. II. Molecular-weight range. *Biotechnol Bioeng* 1994; 44(4): 529-32.

Gornall AG, Bardawill CJ, David MM. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem* 1949; 177(2): 751-66.

Goudarzi M, Madadlou A, Mousavi ME, Emam-Djomeh Z. Optimized preparation of ACE-inhibitory and antioxidative whey protein hydrolysate using response surface method. *Dairy Sci Technol* 2012; 92(6): 641-53.

Grattoni A, Canavese G, Montevocchi FM, Ferrari M. Fast membrane osmometer as alternative to freezing point and vapor pressure osmometry. *Anal Chem* 2008; 80: 2617-22.

Grimble GK, Keohane PP, Higgins BE, Kaminsk Jr MV, Silk DBA. Effect of peptide chain length on amino acid and nitrogen absorption from two lactalbumin hydrolysates in the normal human jejunum. *Clin Sci* 1986; 71(1): 65-9.

Guadix A, Camacho F, Guadix EM. Production of whey protein hydrolysates with reduced allergenicity in a stable membrane reactor. *J Food Eng* 2006; 72(4): 398-405.

Guadix A, Guadix EM, Páez-Dueñas MP, González-Tello P, Camacho F. Procesos tecnológicos y métodos de control em la hidrólisis de proteínas. *Ars Pharmaceutica* 2000; 41(1): 79-89.

Guimarães DH. Utilização de soro de queijo na elaboração de biscoitos doces. *RECEN* 2011; 13(2): 271-85.

Guo Y, Pan D, Tanokura M. Optimisation of hydrolysis conditions for the production of the angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from whey protein using response surface methodology. *Food Chem* 2009; 114: 328-33.

Gupta R, Beg QK, Lorenz P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 2002; 59(1):15-32.

Gustafsson L, Leijonhufvud I, Aronsson A, Mossberg AK, Svanborg C. Treatment of skin papillomas with topical alpha-lactalbumin-oleic acid. *N Engl J Med* 2004; 350(26): 2663-72.

Gwiazda S, Wyrzykowska A, Wasyluk K. Comparison of selected method for determination the degree of hydrolysis of rapeseed proteins. *Pol J Food Nutr Sci* 1994; 44(3): 165-73.

Hakkak R, Korourian S, Shelnut SR, Lensing S, Ronis MJ, Badger TM. Diets containing whey proteins or soy protein isolate protect against 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumors in female rats. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9(1):113-7.

Hakkak R, Korourian S, Ronis MJ, Johnston JM, Badger TM. Dietary whey protein protects against azoxymethane-induced colon tumors in male rats. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10(5):555-558.

Häkanson A, Zhivotovsky B, Orrenius S, Sabharwal H, Svanborg C. Apoptosis induced by a human milk protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92(17): 8064-8.

Haraguchi FK, Abreu WC, Paula H. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. *Rev Nut* 2006; 19(4): 479-88.

Haraguchi FK, Pedrosa ML, Paula H, Santos RC, Silva ME. Influência das proteínas do soro sobre enzimas hepáticas, perfil lipídico e formação óssea de ratos hipercolesterolêmicos. *Rev Nutr* 2009; 22(4): 517-25.

Haraguchi FK, Pedrosa ML, Paula H, Santos RC, Silva ME. Evaluation of biological and biochemical quality of whey protein. *J Med Food* 2010; 13(6):1505-9.

Harding VJ, Warneford FHS. The ninhydrin reaction with amino-acids and ammonium salts J Biol Chem 1916; 25: 319-35.

Hartmann R, Meisel H. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. Curr Opin Biotech 2007; 18(2): 163-9.

Hartree EF. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. Anal Biochem 1972; 48(2): 422-7.

Hayes M, Ross RP, Fitzgerald GF, Stanton C. Putting microbes to work: dairy fermentation, cell factories and bioactive peptides. Part I: overview. Biotechnol 2007a; 2: 426-34.

Hayes M, Stanton C, Fitzgerald GF, Ross RP. Putting microbes to work: dairy fermentation, cell factories and bioactive peptides. Part II: bioactive peptide functions. Biotechnol 2007b; 2: 435-49.

Hegarty JE, Fairclough PD, Moriarty KJ, Kelly MJ, Clark ML. Effects of concentration on *in vivo* absorption of a peptide containing protein hydrolysates. Gut 1982; 23(4):304-9.

Heitz F, Morris MC, Divita G. Twenty years of cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. Brit J Pharm 2009; 157(2): 195-206.

Hernández-Ledesma B, Amigo L, Ramos I, Recio I. Release of angiotensin converting enzyme-inhibitory peptides by simulated gastrointestinal digestion of infant formulas. Int Dairy J 2004; 14: 889-98.

Hernández-Ledesma B, Ramos M, Recio I, Amigo L. Effect of β -lactoglobulin hydrolysis with thermolysin under denaturing temperatures on the release of bioactive peptides. J Chrom A 2006; 1116(1-2): 31-7.

Hernández-Ledesma B, Recio I, Amigo L. β -Lactoglobulin as source of bioactive peptides. Amino Acids 2008; 35(2): 257-65.

Herpandi, Huda N, Rosma A, Wan Nadiah WA. Degree of hydrolysis and free tryptophan content of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) protein hydrolysates produced with different type of industrial proteases. Int Food Res J 2012; 19(3): 863-7.

Hiller A. Determination of albumin and globulin in urine. Proc Sot Exp Biol Med 1927; 24: 385-6.

Hinsberger A, Sandhu BK. Digestion and absorption. Curr Paediatric 2004; 14(7): 605-11.

Hoffmann M, Silva ACP, Siviero J. Prevalência de hipertensão arterial sistêmica e inter-relações com sobrepeso, obesidade, consumo alimentar e atividade física, em estudantes de escolas municipais de Caxias do Sul. Pediatria 2010; 32(3): 163-72.

Holmquist B, Bunning P, Riordan JE. A continuous spectrophotometric assay for the angiotensin converting enzyme. Anal Biochem 1979; 95(1): 40-8.

Horwitz W, Latimer Jr GW. Official methods of analysis of AOAC International. 18th.ed. Gaithersburg: AOAC International, 2007.

Hoyle NT, Merritt JH. Quality of fish protein hydrolysate from herring (*Clupea harengus*). J Food Sci 1994; 59: 76-9.

Hsu KC. Purification of antioxidative peptides prepared from enzymatic hydrolysates of tuna dark muscle by-product. Food Chem 2010; 122: 42-48.

Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. J Agric Food Chem 2005; 53(6): 1841-56.

Hulmi JJ, Lockwood CM, Stout JR. Effect of protein/essential amino acids and resistance training on skeletal muscle hypertrophy: a case for whey protein. Nutr Metab 2010; 7: 51-61.

Ikeda M, Sugiyama K, Tanaka T, Tanaka K, Sekihara H, Shimotohno K, Kato N. Lactoferrin markedly inhibits hepatitis C virus infection in cultured human hepatocytes. Biochem Biophys Res Commun 1998; 245(2): 549-53.

Imamura JKN, Madrona GSM. Reaproveitamento de soro de queijo na fabricação de pão de queijo. RAMA 2008; 1(3):381-90.

In MJ, Chae HJ, Oh NS. Process development for heme-enriched peptide by enzymatic hydrolysis of hemoglobin. Biores Technol 2002; 84(1): 63-8.

Jacobucci HB, Dias NGP, Sgarbieri VC, Borges PZ, Tanikawa C. Impact of different dietary protein on rat growth, blood serum lipids and protein, and liver cholesterol. Nutr Res 2001; 21: 905-15.

Je JY, Qian ZJ, Byun HG, Kim SK. Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. Proc Biochem 2007; 42(5): 840-6.

Jiang J, Chen S, Ren F, Luo Z, Zeng SS. Yak milk casein as a functional ingredient: preparation and identification of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides. J Dairy Res 2007; 74: 18-25.

Jiang Z, Tian B, Brodkorb A, Huo g. Production, analysis and in vivo evaluation of novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from bovine casein. Food Chem 2010; 123: 779-86.

Jodidi SL. Abnormalities in the formol titration method. J Ame Chem Soc 1918; 40: 1031-5.

Jodidi SL. The formol titration of certain amino acids. J Ame Chem Soc 1926; 48(3): 751-3.

Jovanović S, Barać M, Maćej O. Whey proteins - properties and possibility of application. Mljekarstvo 2005; 55(3):215-33.

Ju ZY, Otte J, Madsen JS, Qvist JB. Effects of limited proteolysis on gelation and gel properties of whey protein isolate. J Dairy Sci 1995; 78: 2119-28.

Kanekanian A, Gallagher J, Evans EP. Casein hydrolysis and peptide mapping. *Int J Dairy Technol* 2000; 53(1): 1-5.

Kawase M, Hashimoto H, Hosoda M, Morita H, Hosono A. Effect of administration of fermented milk containing whey protein concentrate to healthy men on serum lipids and blood pressure. *J Dairy Sci* 2000; 83(2):255-63.

Kennedy RS, Konok G, Bounous G, Baruchel S, Lee TD. The use of whey protein concentrate in the treatment of patients with metastatic carcinoma: a phase I-III clinical study. *Anticancer Res* 1995; 15(6B): 2643-9.

Kent KD, Harper WJ, Bomser JA. Effect of whey protein isolate on intracellular glutathione and oxidant-induced cell death in human prostate epithelial cells. *Toxicol in vitro* 2003; 17(1): 27-33.

Keohane PP, Grimble GK, Brown B, Spiller RC. Influence of protein composition and hydrolysis method on intestinal absorption of protein in man. *Gut* 1985; 26(9): 907-13.

Kim SB, Seo IS, Khan MA, Ki KS, Lee WS, Lee HJ, Shin HS, Kim HS. Enzymatic hydrolysis of heated whey: iron-binding ability of peptides and antigenic protein fractions. *J Dairy Sci* 2007; 90(9): 4033-42.

Kingsley GR. The determination of serum total protein, albumin, and globulin by the biuret reaction. *J Biol Chem* 1939; 131(1): 197-200.

Koopman R, Crombach N, Gijzen AP, Walrand S, Fauquant J, Kies AK, Lemosquet S, Saris WHM, Boirie Y, van Loon LJ. Ingestion of a protein hydrolysates is accompanied by an accelerated *in vivo* digestion and absorption rate when compared with its intact protein. *Am J Clin Nutr* 2009; 90(1):106-15.

Kong B, Peng X, Xiong YL, Zhao X. Protection of lung fibroblast MRC-5 cells against hydrogen peroxide-induced oxidative damage by 0.1–2.8 kDa antioxidative peptides isolated from whey protein hydrolysate. *Food Chem* 2012; 135: 540-7.

Kong X, Zhou H, Hua Y. Preparation and antioxidant activity of wheat gluten hydrolysates using ultrafiltration membranes. *J Sci Food Agric* 2008; 88: 920–926.

Koumantakis G, Wyndham LE. An evaluation of osmolality measurement by freezing point depression using micro-amounts of sample. *J Autom Chem* 1989; 11(2): 80-3.

Kuhara T, Iigo M, Itoh T, Ushida Y, Sekine K, Terada N, Okamura H, Tsuda H. Orally administered lactoferrin exerts an antimetastatic effect and enhances production of IL-18 in the intestinal epithelium. *Nutr Cancer* 2000; 38(2):192-199.

Kunwar A, Priyadarsini KI. Free radicals, oxidative stress and importance of antioxidants in human health. *J Med Allied Sci* 2011; 1(2): 53-60.

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 Chem* 2010; 118: 870-5.

Lara MG, Izumi C, Greene LJ, Vilela L, Freitas O. Preparation and scaling up of a low phenylalanine enzymatic hydrolysate of bovine whey protein. *Rev Bras Ciênc Farm*. 2005; 41(4):459-66.

Laursen I, Briand P, Lykkesfeldt AE. Serum albumin as a modulator on growth of the human breast cancer cell line MCF-7. *Anticancer Res* 1990; 10(2A): 343-51.

Layman DK. The role of leucine in weight loss diets and glucose homeostasis. *J Nutr* 2003;133(1):261-7.

Layman DK, Baum JI. Dietary protein impact on glycemic control during weight loss. *J Nutr* 2004; 134(4): 968s-73s.

Layman DK, Shiue H, Sather C, Erickson D, Baum J. Increased dietary protein modifies glucose and insulin homeostasis in adult woman during weight loss. *J Nutr* 2003; 133(2): 405-10.

Leksrisompong PP, Miracle RE, Drake M. Characterization of flavor of whey protein hydrolysates. *J Agric Food Chem* 2010; 58: 6318-27.

Lemieux L, Amiot J. High-performance liquid chromatography of casein hydrolysates phosphorylated and dephosphorylated. I. Peptide mapping. *J Chromat A* 1990; 519(2): 299-321.

Lemieux L, Piot JM, Guillochon D, Amiot J. Study of the efficiency of a mobile phase used in size-exclusion HPLC for the separation of peptides from a casein hydrolysate according to their hydrodynamic volume. *Chromatographia* 1991; 32(11): 499-504.

Levy M. Equilibria in the formol titration. *J Biol Chem* 1933; 99: 767-79.

Levy M. Equilibria of the basic amino acids in the formol titration. *J Biol Chem* 1935; 109: 365-81.

Li GH, Lea GW, Shi YH, Shrestha S. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmacological effects. *Nutr Res* 2004; 24: 469-86.

Li L, Wang J, Zhao M, Cui C, Jiang Y. Artificial neural network for production of antioxidant peptides derived from bighead carp muscles with Alcalase. *Food Technol Biotechnol* 2006; 44(3): 441-8.

Li X, Han L, Chen L. *In vitro* antioxidant activity of protein hydrolysates prepared from corn gluten meal. *J Sci Food Agric* 2008; 88:1660-6.

Li-Jun L, Chuan-He Z, Zheng, Z. Analyzing molecular weight distribution of whey protein hydrolysates. *Food Bioprod Process* 2007; 86(1): 1-6.

Lima RN, Lima PO, Aroeira LJM, Miranda MVFG, Lopes KTL, Diógenes GV, Pereira MIB, Souza ITN, Rossato CH. Desempenho de bezerros aleitados com soro de queijo em associação ao colostro. *Pesq Agropec Bras* 2012; 47(8): 1174-80.

Lima RN, Lima PO, Cândido MJD, Pontes FST, Moreira RHR, Aquino RMS. Avaliação econômica de dietas líquidas à base de soro de queijo *in natura* para bezerros. *Rev Bras Saúde Prod Anim* 2011; 12(1):14-21.

Lin S, Tian W, Li H, Cao J, Jiang W. Improving antioxidant activities of whey protein hydrolysates obtained by thermal preheat treatment of pepsin, trypsin, Alcalase and Flavourzyme. *Int J Food Sci Technol* 2012; 47(10): 2045-51.

Lira TBF, Bezerra VS, Silva FO, Dias GMP, Lima Filho JL, Porto TS, Porto ALF. Avaliação de variáveis que influenciam a hidrólise enzimática da caseína do leite de cabra Moxotó. *Pesq Agropec Bras* 2012; 45(9): 1036-43.

Liu Q, Kong B, Xiong YL, Xia X. Antioxidant activity and functional properties of porcine plasma protein hydrolysate as influenced by the degree of hydrolysis. *Food Chem* 2010; 118: 403-10.

Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: impact on human health. *Phcog Rev* 2010; 4(8): 118-126.

Lopes DCF, Bizzotto CS, Carreira RL, Afonso WO, Lopes Jr. VO, Silvestre MPC. Removal of phenylalanine from protein hydrolysates prepared with rice. *J Food Technol* 2008; 6: 57-65.

Lopes DCF, Delvivo FM, Januário JN, Aguiar MJB, Starling ALP, Silvestre MPC. Phenylalanine removal from whey hydrolysates. *J Food Technol* 2007; 5(2): 191-7.

Lopes DCF, Delvivo, FM, Silvestre, MPC. Dietary supplements for phenylketonuria removing Phe by activated carbon. *Nut Food Sci.* 2006; 36(2): 96-104.

Lopes DCF, Delvivo FM, Silvestre MPC. Peptide profiles using two proteolytic enzymes. *Brit Food J* 2005; 107(1): 42-53.

López-Fandiño R, Otte J, Camp J. Physiological, chemical and technological aspects of milk-protein-derived peptides with antihypertensive and ACE-inhibitory activity. *Int Dairy J* 2006; 16: 1277-93.

Lord RCC. Osmosis, osmometry and osmoregulation. *Postgrad Med J* 1999; 75: 67-73

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193(1): 265-75.

Lurbe E, Cifkova R, Cruickshank JK, Dillon MJ, Ferreira I, Invitti C et al. Management of high blood pressure in children and adolescents: recommendations of the European Society of Hypertension. *J Hypertension* 2009; 27(9): 1719-42.

Luvielmo MM, Antunes AJ. Substituição de proteínas da carne por proteínas do concentrado proteico de soro e adição de CaCl₂ em sistema cárneo. Bol CEPPA 2006; 24(1): 25-46.

MacIntosh GH, Regester GO, Leu RK, Royle PJ, Smithers GW. Dairy proteins protect against dimethylhydrazine-induced intestinal cancers in rats. J Nutr 1995; 125(4): 809-16.

Madureira AR, Pereira CI, Gomes AMP, Pintado ME, Malcata FX. Bovine whey proteins: overview on their main biological properties. Food Res Int 2007; 40(10): 1197-211.

Mahmoud MI, Cordle CT. Protein hydrolysates as special nutritional ingredients. In: Doxastakis G, Kiosseoglou V. Novel macromolecules in food systems. New York: Elsevier Science, 2000. p. 181-215.

Margot A, Flaschel E, Renken A. Continuous monitoring of enzymatic whey-protein hydrolysis - correlation of base consumption with soluble nitrogen-content. Proc Biochem 1994; 29(4): 257-62.

Marinova G, Batchvarov V. Evaluation of the methods for determination of the free radical scavenging activity by DPPH. Bulg J Agric Sci 2011; 17(1): 11-24.

Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. Eur J Biochem 1974; 47: 469-474.

Martínez KD, Sánchez CC, Patino JMR, Pilosof AMR. Interfacial and foaming properties of soy protein and their hydrolysates. Food Hydrocol 2009; 23(8): 2149-57.

Martins MTS. Caracterização química e nutricional de plasteína produzida a partir de hidrolisado pancreático de isolado protéico de soja. Cien Tecnol Alim 2005; 25(4): 683-90.

Matsumoto H, Shimokawa Y, Ushida Y, Toida T, Hayasawa H. New biological function of bovine alpha-lactalbumin: protective effect against ethanol-and stress-induced gastric mucosal injury in rats. Biosci Biotechnol Biochem 2001; 65(5): 1104-11.

Matthews D, Adibi SA. Peptide absorption. Gastroenterol 1976; 71(1): 151-61.

Mezzaroba LFH, Carvalho JE, Ponezi NA, Antônio MA, Monteiro KM, Possenti A, Sgarbieri VC. Antiulcerative properties of bovine α -lactalbumin. Int Dairy J 2006; 16(9): 1005-12.

McIntosh GH, Le Leu RK. The influence of dietary proteins on colon cancer risk. Nutr Res 2001; 21(7): 1053-66.

Meyer H. The ninhydrin reaction and its analytical applications. Biochem J 1957; 67: 333-40.

Micke P, Beeh KM, Buhl R. Effects of long-term supplementation with whey proteins on plasma glutathione levels of HIV-infected patients. Eur J Nutr 2002; 41(1): 12-8.

Micke P, Beeh M, Schalaak F, Buhl R. Oral supplementation with whey proteins increases plasma glutathione levels of HIV-infected patients. Eur J Clin Invest 2001; 31(2): 171-8.

- Miguel M, Contreras MM, Recio I, Aleixandre A. ACE-inhibitory and anti hypertensive properties of a bovine casein hydrolysate. *Food Chem* 2009; 112: 211-4.
- Miguel M, Manso MA, López-Fandiño R, Alonso MJ, Salaices M. Vascular effects and antihypertensive properties of k-casein macropeptide. *Int Dairy J* 2007; 17(12): 1473-7.
- Miller GD, Jarvis JK, McBean LD. *Handbook of dairy products and nutrition*. 2 ed. Champaign, IL: CRC Press; 2000.
- Mizuno S, Matsuura K, Gotou T, Nishimura S, Kajimoto O, Yabune M et al. Antihypertensive effect of casein hydrolysates in a placebo-controlled study in subjects with high-normal blood pressure and mild hypertension. *British J Nutr* 2005; 94: 84-91.
- Mizuno S, Nishimura S, Matsuura K, Gotou T, Yamamoto N. Release of short and proline-rich antihypertensive peptides from casein hydrolysate with an *Aspergillus oryzae* protease. *J Dairy Sci* 2004; 87: 3183-8.
- Molla AE, Hovannisyan HG. Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of beluga *Huso huso* using Protamex. *Int Aquat Res* 2011; 3: 93-9.
- Monterrey-Quintero ES, Sobral PJA. Preparo e caracterização de proteínas miofibrilares de tilápia-do-nilo para elaboração de biofilmes. *Pesq Agropec Bras* 2000; 35(1): 179-89.
- Möller NP, Scholz-Ahrens KE, Roos N, Schrezenmeir J. Bioactive peptides and protein from foods: indication for health effects. *Eur J Nutr* 2008; 47: 171-82.
- Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J Sci Technol* 2004; 26(2): 211-219.
- Moore S, Stein WH. A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds. *J Biol Chem* 1954; 211(2): 907-13.
- Moore S, Stein WH. Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids. *J Biol Chem* 1948; 176(1): 367-88.
- Morais HA, Barbosa CMS, Delvivo FM, Mansur HS, Oliveira MC, Silvestre MPC. Comparative study of microencapsulation of casein hydrolysates in lipospheres and liposomes. *J Food Biochem* 2004; 28(1):21-41.
- Morais HA, Barbosa CMS, Lopes DCF, Oliveira MC, Silvestre MPC. Caracterização do perfil peptídico e de aminoácidos em hidrolisados de caseína. *Arch Latinoamer Nutr* 2002; 52(1):77-83.
- Morais HA, Marco LM, Oliveira MC, Silvestre MPC. Casein hydrolysates using papain: peptide profile and encapsulation in liposomes. *Acta Alim* 2005; 34(1): 59-69.
- Morato AF, Carreira RL, Junqueira RG, Silvestre MPC. Optimization of casein hydrolysis for obtaining high contents of small peptides: use of subtilisin and trypsin. *J Food Comp Anal* 2000; 13(5):843-57.

Moreno YF, Sgarbieri VC, da Silva MN, Toro AA, Vilela MM. Features of whey protein concentrate supplementation in children with rapidly progressive HIV infection. *J Trop Pediatr* 2006; 52(1): 34-8.

Moreno-Indias I, Castro N, Morales-Delanuez A, Sánchez-Macías D, Assunção P, Capote J, Argüello A. Farm and factory production of goat cheese whey results in distinct chemical composition. *J Dairy Sci* 2009; 92(10):4792-6.

Mullally MM, Meisel H, Fitzgerald RJ. Identification of a novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptide corresponding to a tryptic fragment of bovine β -lactoglobulin. *FEBS Letters* 1997; 402(2-3): 99-101.

Nagaoka S, Futamura Y, Miwa K, Awano T, Yamauchi K, Kanamaru Y, Tadashi K, Kuwata T. Identification of novel hypocholesterolemic peptides derived from bovine milk β -lactoglobulin. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 281(1): 11-7.

Nagaoka S, Kanamaru Y, Kusuya Y. Effects of whey protein and casein on the plasma and liver lipids in rats. *Agric Biol Chem* 1991; 55(3): 818-18.

Nagaoka S, Kanamaru Y, Kusuya Y, Kojima T, Kuwata T. Comparative studies on the serum cholesterol lowering action of whey protein and soybean protein in rats. *Biosci Biotech Biochem* 1992; 56(9): 1484-85.

Nagy A, Marciniak-Darmochwał K, Krawczuk S, Mierszejewska D, Kostyra H, Gelencsér E. Influence of glycation and pepsin hydrolysis on immunoreactivity of albumin/globulin fraction of herbicide resistant wheat line. *Czech J Food Sci* 2009; 27(5): 320-9.

Nakajima K, Yoshie-Stark Y, Ogushi M. Comparison of ACE inhibitory and DPPH radical scavenging activities of fish muscle hydrolysates. *Food Chem* 2009; 114: 844-51.

Nascimento WCA, Martins MLL. Produção de proteases por *Bacillus sp.* SMIA-2 crescido em soro de leite e água de maceração de milho e compatibilidade das enzimas com detergentes comerciais. *Cienc Tecnol Alim* 2006; 26(3): 582-588.

Nemati M, Javadian SR, Ovissipour M, Keshavarz M. A study on the properties of alosa (*Alosa caspia*) by-products protein hydrolysates using commercial enzymes. *World Appl Sci J* 2012; 18(7): 950-6.

Nery TBR, Brandão LV, Esperidião MCA, Druzian JI. Biossíntese de goma xantana a partir da fermentação de soro de leite: rendimento e viscosidade. *Quim Nova* 2008; 31(8): 1937-41.

Nesterenko A, Alric I, Silvestre F, Durrieu V. Influence of soy protein's structural modifications on their microencapsulation properties: α -tocopherol microparticles preparation. *Food Res Int* 2012; 48(2): 387-96.

Neves RAM, Mira NVM, Marquez UML. Caracterização de hidrolisados enzimáticos de pescado. *Cienc Tecnol Aliment* 2004; 24(1): 101-8.

Newey H, Smyth, DH. Cellular mechanisms in intestinal transfer of amino acid. *J Physiol* 1962; 164(3): 527-51.

Nielsen PM, Petersen D, Dambmann C. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *J Food Sci* 2001; 66(5): 642-6.

Nielsen SS. *Food analysis*. 3. ed. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003. p. 131-42.

Nixon E, Mawer GE. The digestion and absorption of protein in man. 2. The form in which digested proteins is absorbed. *Brit J Nut* 1970; 24(1): 241-58.

Nogueira R, Lämmerhofer M, Lindner W. Alternative high-performance liquid chromatographic peptide separation and purification concept using a new mixed-mode reversed-phase/weak anion-exchange type stationary phase. *J Chromat A* 2005; 1089(1-2): 158-69.

Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). *Enzyme Nomenclature: recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the nomenclature and classification of enzymes by the reactions they catalyse*. Londres: School of Biological and Chemical Sciences, Queen Mary University, 2010. [acesso em 17 out 2011]. Disponível em: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>.

Northrop JH. A convenient method for the formol titration. *J Gen Physiol* 1926; 9(6): 767-9.

Novozymes. Alcalase® de grau alimentício. Araucária, PR: Novozymes Latin America Ltda, 2002a. (Ficha técnica).

Novozymes. Flavourzyme™. Araucária, PR: Novozymes Latin America Ltda, 2002b. (Ficha técnica).

Oliveira DF, Bravo CEC, Tonial IB. Soro de leite: um subproduto valioso. *Rev Inst Latic Cândido Tostes* 2012; 67(385): 64-71.

Otte J, Ju ZY, Færgemand M, Lomholt SB, Qvist KB. Protease-induced aggregation and gelation of whey proteins. *J Dairy Sci* 1996; 61(5): 911-6.

Otte J, Shalaby SMA, Zakora M, Pripp AH, El-Shabrawy SA. Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of milk protein hydrolysates: effect of substrate, enzyme and time of hydrolysis. *Int Dairy J* 2007a; 17: 488-503.

Otte J, Shalaby SMA, Zakora M, Nielsen MS. Fractionation and identification of ACE-inhibitory peptides from α -lactalbumin and β -casein produced by thermolysin-catalysed hydrolysis. *Int Dairy J* 2007b; 17(2): 1460-72.

Ovissipour M, Abedian A, Motamedzadegan A, Rasco B, Safari R, Shahiri H. The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from Persia sturgeon (*Acipenser persicus*) viscera. *Food Chem* 2009; 115(1): 238-42.

Ovissipour M, Benjakul S, Safari R, Motamedzadegan A. Fish protein hydrolysates production from yellowfin tuna *Thunnus albacares* head using Alcalase and Protamex. *Int Aquat Res* 2010; 2: 87-95.

Ozyurt D, Demirata B, Apak R. Determination of total antioxidant capacity by a new spectrophotometric method based on Ce(IV) reducing capacity measurement. *Talanta* 2007; 71(3): 1155-65.

Pacheco MTB, Bighetti E, Antônio M, Carvalho JE, Rosaneli CF, Sgarbieri VG. Efeito de um hidrolisado de proteínas de soro de leite e de seus peptídeos na proteção de lesões ulcerativas da mucosa gástrica de ratos. *Rev Nut* 2006; 19(1): 47-55.

Pacheco MTB, Dias NFG, Baldini VLS, Tanikawa C, Sgarbieri VC. Propriedades funcionais de hidrolisados obtidos a partir de concentrados proteicos de soro de leite. *Cienc Tecnol Aliment* 2005; 25(2): 333-8.

Pacheco MTB, Sgarbieri VC. Effect of different hydrolysates of whey protein on hepatic glutathione content in mice. *J Med Food* 2005; 8(3):337-42.

Page MJ, Di Cera E. Serine peptidases: classification, structure and function. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65(7-8):1220-36.

Pagno CH, Baldasso C, Tessaro IC, Flores SH, Jong EV. Obtenção de concentrados proteicos de soro de leite e caracterização de suas propriedades funcionais tecnológicas. *Alim Nut* 2009; 20(2): 231-9.

Panasiuk R, Amarowicz R, Kostyra H, Sijtsma L. Determination of α -amino nitrogen in pea protein hydrolysates: a comparison of three analytical methods. *Food Chem* 1998; 62(3): 363-7.

Paraman I, Hettiarachchy NS, Schaefer C, Beck MI. Hydrophobicity, solubility, and emulsifying properties of enzyme-modified rice endosperm protein. *Cereal Chem* 2007; 84(4): 343-9.

Pardo MF, Natalucci C. Electrophoresis analysis (tricine-SDS-PAGE) of bovine caseins. *Acta Farm Bonaerense* 2002; 21(1): 57-60.

Park SY, Lee JS, Baek HH, Lee HG. Purification and characterization of antioxidant peptides from soy protein hydrolysates. *J Food Biochem* 2010; 34: 120-132.

Paula JCJ, Almeida FA, Pinto MS, Teodoro VAM, Costa RGB. Aproveitamento de soro de queijo de coalho na elaboração de bebida láctea pasteurizada. *Rev Inst Latic Cândido Tostes* 2012; 67(387): 13-20.

Pavar MC, Hanif K, Azam A, Lata S, Pasha MAQ, Pasha S. Structure activity relationship study between ornithyl-proline and lysil-proline based tripeptidomimics as angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Bioorg Med Chem Letters* 2006; 16: 2117-21.

Pearce KN. Use of fluorescamine to determine the rate of release of casein-macropptides in rennet-treated milk. *New Zealand J Dairy Sci Technol* 1979; 14(3): 233-9.

Pedroche J, Yust MM, Lqari H, Girón-Calle J, Vioque J, Alaiz M, Millán F. Production and characterization of casein hydrolysates with a high amino acid Fischer's ratio using immobilized proteases. *Int Dairy J* 2004; 14: 527-33.

Pegg RB, Rybarczyk A, Amarowicz R. Determination of hippuric acid by RP-HPLC using two different analytical columns – a short report. *Pol J Food Nutr Sci* 2007; 57(4): 447-50.

Peñas E, Prestamo G, Gomez R. High pressure and the enzymatic hydrolysis of soybean whey proteins. *Food Chem* 2004; 85: 641-8.

Peña-Ramos EA, Xiong YL. Antioxidative activity of whey protein hydrolysates in a liposomal system. *J Dairy Sci* 2001; 84(2): 2577-83.

Peña-Ramos EA, Xiong YL, Arteaga GE. Fractionation and characterisation for antioxidant activity of hydrolysed whey protein. *J Sci Food Agric* 2004; 84:1908-1918.

Peng X, Kong B, Xia X, Liu Q. Reducing and radical scavenging activities of whey protein hydrolysates prepared with Alcalase. *J Dairy J* 2010; 20:360-365.

Phelan M, Aherne-Bruce SA, O'Sullivan D, Fitzgerald RJ, O'Brien NM. Potential bioactive effects of casein hydrolysates on human cultured cells. *Int Dairy J* 2009; 19: 279-285.

Pinto SL, Silva RCR, Priore SE, Assis AMO, Pinto EJ. Prevalência de pré-hipertensão e de hipertensão arterial e avaliação de fatores associados em crianças e adolescentes de escolas públicas de Salvador, Bahia, Brasil. *Cad Saúde Pública* 2011; 27(6): 1065-76.

Platerink CJ, Janssen RGM, Horsten R, Haverkamp J. Quantification of ACE inhibiting peptides in human plasma using high performance liquid chromatography–mass spectrometry. *J Chromat B* 2006; 830: 151-7.

Polgár L. The catalytic triad of serine peptidases. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62(19-20): 2161-72.

Porto LM, Santos RC, Miranda TLS. Determinação das melhores condições operacionais do processo de produção da ricota. *Boletim do CEPPA* 2005; 23(1):173-82.

Pralea D, Dumitrascu L, Borda D, Stănciuc N. Functional properties of sodium caseinate hydrolysates as affected by the extent of chymotrypsinolysis. *J Agroalim Proc Technol* 2011; 17(3): 308-14.

Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardize methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem* 2005; 53: 4290-4302.

Quirós A, Contreras MM, Ramos M, Amigo L, Recio I. Stability to gastrointestinal enzymes and structure–activity relationship of b-casein peptides with antihypertensive properties. *Peptides* 2009; 30: 1848-53.

Rao M, Tanksale AM, Ghatge MS, Deshpande, VV. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol Mol Biol Res* 1998; 62(3):597-635.

Raviraj A, Prakash V, Kaul P. Study of bovine whey hydrolyzate to enhance it's antioxidant properties. *Aust J Basic Applied Sci* 2010; 4(8): 3388-98.

Rawlings ND. A large and accurate collection of peptidase cleavages in the MEROPS database. *Database* 2009; 2009: bap015. [acesso em 18 fev 2013]. Disponível em: <http://www.database.oxfordjournals.org>.

Rawlings ND, Barrett AJ, Bateman A. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* 2010; 38(Database issue):D227-33.

Rawlings ND, Morton FR, Barrett AJ. An introduction to peptidases and the MEROPS database. In: Polaina J, MacCabe AP. *Industrial enzymes: structure, functions and applications*. Dordrecht: Springer; 2007. p.161-79.

Ren J, Zhao M, Shi J, Wang J, Jiang Y, Cui C, Kakuda Y, Xue SJ. Purification and identification of antioxidant peptides from grass carp muscle hydrolysates by consecutive chromatography and electro spray ionization-mass spectrometry. *Food Chem* 2008; 108: 727-36.

Rérat AA. Nutritional supply of proteins and absorption of their hydrolysis products: consequences on metabolism. *Proc Nutr Soc* 1993; 52(2): 335-44.

Reuter EM, Reuter CP, Burgos LT, Reckziegel MMB, Nedel FB, Albuquerque IM et al. Obesidade e hipertensão arterial em escolares de Santa Cruz do Sul – RS, Brasil. *Rev Assoc Med Bras* 2012; 58(6): 666-72.

Riegler EZ. Determination of serum total protein. *Anal Chem* 1914; 63: 242.

Robinson HW, Hodgen CC. The biureto reaction in the determination of serum proteins. 1. A study of the conditions necessary for the production of the stable color which bears a quantitative relationship to the protein concentration. *J Biol Chem* 1940; 135: 707-25.

Rosaneli CF, Bighetti AE, Antonio MA, Carvalho JE, Sgarbieri VC. Efficacy of a whey protein concentrate on the inhibition of stomach ulcerative lesions caused by ethanol ingestion. *J Med Food* 2002; 5(4): 221-8.

Roth M. Fluorescence reaction for amino acids. *Anal Chem* 1971; 43(7): 880-2.

Roufik S, Gauthier SF, Turgeon SL. *In vitro* digestibility of bioactive peptides derived from bovine β -lactoglobulin. *Int Dairy J* 2006; 16(4): 294-302.

Rover Júnior L, Höehr NF, Vellasco AP, Kubota LT. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. *Quim Nova* 2001; 24(1):112-9.

- Roy MK, Kuwabara Y, Hara K, Watanabe Y, Tamai Y. Peptides from N-terminal end of lactoferrin induce apoptosis in human leukemic (HL-60) cells. *J Dairy Sci* 2001; 85(9): 2065-74.
- Rubio LA, Clemente A. Molecular size distribution affects portal absorption rate of casein amino acids in rats. *J Anim Physiol Anim Nutr* 2010; 94(5): 145-53.
- Rubio LA, Daniel H. Mammalian peptide transporters as targets for drug delivery. *Trends in Pharmacol Sci* 2002; 23(9): 434-40.
- Ruhemann S. Triketohydrindene hydrate. *J Chem Soc Trans* 1910; 97: 2025-31.
- Rutherford SM. Methodology for determining degree of hydrolysis of proteins in hydrolysates: a review. *Food Comp Additives* 2010; 93(5): 1515-22.
- Sadat L, Cakir-Kiefer C, N'Negue MA, Gaillard JL, Girardet JM, Miclo L. Isolation and identification of antioxidative peptides from bovine α -lactalbumin. *Int Dairy J* 2011; 21: 214-21.
- Saint-Sauveur D, Gauthier SF, Boutinb Y, Montoni A. Immuno modulating properties of a whey protein isolate, its enzymatic digest and peptide fractions. *Int Dairy J* 2008; 18: 260-70.
- Sallas-Melado M, Prentice-Hernández C, Moraes KS, Zavareze ER. Produção de hidrolisado de cabrinha (*Prionotus punctatus*) e o efeito na composição química e características tecnológicas de pão. *Rev Bras Agrocienc* 2007; 13(3): 349-53.
- Samaranayaka AGP, Li-Chan ECY. Food-derived peptidic antioxidants: a review of their production, assessment, and potential applications. *J Func Foods* 2011; 3: 229-54.
- Sánchez-Moreno C. Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Sci Tech Int* 2002; 8(3): 121-37.
- Santiago PA, Marquez LDS, Cardoso VL, Ribeiro EJ. Estudo da produção de β -galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus*. *Cienc Tecnol Alim* 2004; 24(4): 567-72.
- Santos SA, Martins VG, Sallas-Melado M, Prentice-Hernández P. Otimização dos parâmetros de produção de hidrolisados proteicos enzimáticos utilizando pescado de baixo valor comercial. *Quim Nova* 2009; 32(1): 72-7.
- Sarmadi BH, Ismail A. Antioxidative peptides from food proteins: a review. *Peptides* 2010; 31(10):1949-56.
- Satake K, Okuyama T, Ohashi M, Shinoda T. The spectrophotometric determination of amine, amino acid and peptide with 2,4,6-trinitrobenzene 1-sulfonic acid. *J Biochem* 1960; 47: 654-60.
- Sattler FR, Rajjicic N, Mulligan K, Yarasheski KE, Koletar SL, Zolopa A, Smith, BA, Zackin R, Bistrián B. Evaluation of high-protein supplementation in weigh-stable HIV-positive

subjects with a history of weight loss: a randomized, double-blind, multicenter trial. *Am J Clin Nutr* 2008; 88(5): 1313-21.

Sautier C, Dieng K, Flament C, Doucet C, Suquet JP, Lemonnier D. Effects of whey protein, casein, soya-bean and sunflower proteins on the serum, tissue and fecal steroids in rats. *Br J Nutr* 1983; 49(3):313-9.

Schaafsma G. Safety of protein hydrolysates, fractions thereof and bioactive peptides in human nutrition. *Eur J Clin Nutr* 2009; 63(10):1161-8.

Schmidt DG, Poll JK. Enzymatic hydrolysis of whey proteins. Hydrolysis of α -lactoalbumin and β -lactoglobulin in buffer solutions by proteolytic enzymes. *Netherl Milk Dairy J* 1991; 45(4): 225-40.

Schmidt CG, Sallas-Melado M. Influência da ação das enzimas Alcalase e Flavourzyme no grau de hidrólise das proteínas de carne de frango. *Quim Nova* 2009; 32(5): 1144-50.

Schwartz TB, Engel FL. A photometric ninhydrin method for the measurement of proteolysis. *J Biol Chem* 1950; 184: 197-202.

Sgarbieri VC. Revisão: propriedades estruturais e físico-químicas das proteínas do leite. *Braz J Food Technol* 2005; 8(1): 43-56.

Shalaby SM, Zakora M, Otte J. Performance of two commonly used angiotensin-converting enzyme inhibition assays using FAPGG and HHL as substrates. *J Dairy Res* 2006; 73: 178-86.

Sheih IC, Wu TK, Fang Tj. Antioxidant properties of a new antioxidative peptide from algae protein waste hydrolysate in different oxidation systems. *Biores Technol* 2009; 100: 3419-3425.

Shin HS, Kim SB, Kang SC, Khan MA, Kim HS, Shin HJ, Chang CH. Production of low antigenic cheese whey protein hydrolysates using mixed proteolytic enzymes. *J Sci Food Agric* 2007; 87(11): 2055-60.

Silk DBA, Kumar PJ, Perret D, Clark ML, Dawson AM. Amino acid and peptide absorption in patients with coeliac disease and dermatitis herpetiformis. *Gut* 1974; 15(1): 1-8.

Silk DBA, Grimble GK, Rees, RG. Protein digestion and amino acid and peptide absorption. *Proc Nutr Soc* 1985; 44:63-72.

Silva CA, Gomes JP, Silva FLH, Melo ESRL, Caldas MCS. Utilização de soro de leite na elaboração de pães: estudo da qualidade sensorial. *Rev Bras Prod Agroind* 2011; 13(nº especial): 355-62.

Silva K, Bolini HMA. Avaliação sensorial de sorvete formulado com produto de soro ácido de leite bovino. *Cienc Tecnol Alim* 2006; 26(1): 116-22.

Silva MC, Silva VDM, Lana AMQ, Silvestre MPC. Grau de hidrólise e perfil peptídico de hidrolisados enzimáticos do concentrado proteico de soro de leite. *Alim Nut* 2009; 20(3): 395-402.

Silva MR. Obtenção de hidrolisados enzimáticos do concentrado proteico de soro de leite com alto teor de oligopeptídeos e elevada atividade inibitória sobre a enzima conversora de angiotensina, utilizando a pancreatina e a papaína. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia/Universidade Federal de Minas Gerais, 2010. (Dissertação de Mestrado).

Silva MR, Rodrigues DF, Lana FC, Silva VDM, Morais HA, Silvestre MPC. Perfil peptídico de hidrolisados enzimáticos do concentrado proteico do soro de leite, obtidos pela ação da pancreatina e da papaína. *Nutrire* 2010; 35(3): 97-114.

Silva VDM, Marco LM, Afonso WO, Lopes DCF, Januário JN, Aguiar MJB, Starling ALP, Silvestre MPC. Preparation of low-phenylalanine whey hydrolysates using papain and pancreatin immobilized on activated carbon and alumina. *Am J Food Technol* 2007; 2(5): 327-41.

Silvestre MPC. Review of methods for the analysis of protein hydrolysates. *Food Chem* 1997; 60(2): 263-71.

Silvestre MPC, Afonso WO, Lopes Junior CO, Silva VDM, Morais HA, Souza MWS, Silva MR. Use of subtilisin and pancreatin for hydrolysing whey protein concentrate. *Am J Food Technol* 2011a; 6(8): 647-60.

Silvestre MPC, Hamon M, Yvon M. Analyses of protein hydrolysates. 1. Use of poly (2-hydroxyethyl-aspartamide)-silica column in size-exclusion chromatography for the fractionation of casein hydrolysates. *J Agric Food Chem* 1994a; 42(12): 2778-82.

Silvestre MPC, Hamon M, Yvon M. Analyses of protein hydrolysates. 2. Characterization of casein hydrolysates by a rapid peptide quantification method. *J Agric Food Chem* 1994b; 42(1): 2783-89.

Silvestre MPC, Lait E, Dauphin C, Hamon M. Cuprimetric assay of casein hydrolysates. *J AOAC Int* 1993; 76(6): 1295-99.

Silvestre MPC, Silva MC, Silva VDM, Silva MR, Amorin LL. WPC hydrolysates obtained by the action of a pancreatin: preparation, analysis and phenylalanine removal. *Asian J Sci Res* 2011b; 4(4): 302-314.

Silvestre MPC, Silva MR, Silva VDM, Souza MWS, Lopes Junior CO, Afonso WO. Analysis of whey protein hydrolysates: peptide profile and ACE inhibitory activity. *Braz J Pharma Sci* 2012; 48: 747-57.

Simões e Silva AC, Flynn JT. The renin-angiotensin-aldosterone system in 2011: role in hypertension and chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol* 2012; 27(10): 1835-45.

Simons SS, Johnson DF. The structure of the fluorescent adduct formed in the reaction of o-phthalaldehyde and thiols with amine. *J Am Chem Soc* 1976; 93: 7098-9.

Sinha R, Radha C, Prakash J, Kaul P. Whey protein hydrolysate: functional properties, nutritional quality and utilization in beverage formulation. *Food Chem* 2007; 101(4): 1484-91.

Šližytė R., Mozuraitytė R, Martínez-Alvarez O, Falch E. Functional, bioactive and antioxidative properties of hydrolysates obtained from cod (*Gadus morhua*) backbones. *Process Biochem* 2009; 44(6): 668-77.

Smith C, Marks AD, Lieberman M. Bioquímica médica básica de Marks: uma abordagem clínica. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2007. p. 439-457.

Smithers GW. Whey and whey proteins: from 'gutter-to-gold'. *Int Dairy J* 2008; 18(7): 695-704.

Soares RDL, Biasutti EAR, Capobianco M, Vieira CR, Silva VDM, Morais HA, Januário JN, Aguiar, MJB, Silvestre, MPC. Preparation of enzymatic skim milk hydrolysates with low phenylalanine content. *Acta Farm Bonaerense* 2006; 25(3): 325-32.

Soares RDL, Capobianco MB, Rolim EA, Silvestre MPC. Enzyme-catalyzed production of oligopeptides from skim milk. *Food Biotechnol* 2007; 21(1): 45-56.

Sociedade Brasileira de Cardiologia; Sociedade Brasileira de Hipertensão; Sociedade Brasileira de Nefrologia. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. *Arq Bras Cardiol* 2010; 95(supl.1): 1-51.

Souza MWS, Biasutti EAR, Carreira RL, Afonso WO, Silva VDM, Silvestre MPC. Obtaining oligopeptides from whey: use of subtilisin and pancreatin. *Am J Food Technol* 2008; 3(5): 315-24.

Spellman D, Kenny P, O'Cuinn G, Fitzgerald RJ. Aggregation properties of whey protein hydrolysates generated with *Bacillus licheniformis* proteinase activities. *J Agric Food Chem* 2005; 53(4): 1258-65.

Spellman D, Mcevoy E, O'Cuinn G, Fitzgerald RJ. Protease and exopeptidase hydrolysis of whey protein: comparasion of the TNBS, OPA e pH-stat method for quantification of degree of hydrolysis. *Int Dairy J* 2003; 13(6): 447-53.

Stanciu N, Hintoiu A, Stanciu S, Rapeanu G. Thermal treatment can modify the susceptibility of whey protein concentrate to enzymatic hydrolysis. *Innov Rom Food Biotechnol* 2010; 7: 30-6.

Svensson M, Håkansson A, Mossberg AK, Linse S, Svanborg C. Conversion of alpha lactalbumin to a protein inducing apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(8): 4221-6.

Szymkiweicz A, Jędrychowski L. Effect of acylation and enzymatic modification on pea proteins allergenicity. *Pol J Food Nutr Sci* 2008; 58(3): 345-50.

Takeiti CY, Souza AS, Netto FM. Influência do tratamento térmico nas propriedades de solubilidade e de emulsificação de isolados proteicos de soja e de seus hidrolisados enzimáticos. *Braz J Food Technol* 2004; 7(1): 87-101.

Tang X, He Z, Dai Y, Xiong YL, Xie M, Chen J. Peptide fractionation and free radical scavenging activity of zein hydrolysate. *J Agric Food Chem* 2010; 58(1): 587-93.

Tavares MFM. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. *Quim Nova* 1997; 20(5): 493-511.

Tavares, TG, Contreras MM, Amorim M, Martín-Álvares PJ, Pintado ME, Recio I, Malcata FX. Optimisation, by response surface methodology, of degree of hydrolysis and antioxidant and ACE-inhibitory activities of whey protein hydrolysates obtained with cardoon extract. *Int Dairy J* 2011; 21: 926-33.

Taylor WH. Formol titration: an evaluation of its various modifications. *The Analyst* 1957; 82(976): 488-98.

Terra NN, Fries LLM, Milani LIG, Richards NSPS, Rezer APS., Backes SB, Santos BA. Emprego de soro de leite líquido na elaboração de mortadela. *Ciênc Rural* 2009; 39(3):885-90.

Ting BPCP, Mine Y, Juneja LR, Okubo T, Gauthier SF, Pouliot Y. Comparative composition and antioxidant activity of peptide fractions obtained by ultrafiltration of egg yolk protein enzymatic hydrolysates. *Membranes* 2011; 1: 149-61.

Tipton KD, Elliott TA, Cree MG, Aarsland AA, Sanford AP, Wolfe RR. Stimulation of net muscle protein synthesis by whey protein ingestion before and after exercise. *Am J Physiol-Endoc M* 2007; 292(1): 71-6.

Tong LM, Sasaki S, McClements DJ, Decker EA. Mechanisms of the antioxidant activity of a high molecular weight fraction of whey. *J Agric Food Chem* 2000; 48(5):1473-8.

Torruco-Uco J, Chel-Guerrero L, Martínez-Ayala A, Dávila-Ortíz G, Betancur-Ancona D. Angiotensin-I converting enzyme inhibitory and antioxidant activities of protein hydrolysates from *Phaseolus lunatus* and *Phaseolus vulgaris* seeds. *LWT – Food Sci Technol* 2009; 42: 1597-604.

Troll W, Cannon RK. A modified photometric ninhydrin method for the analysis of amino and imino acids. *J Biol Chem* 1953; 200(2): 803-11.

Tsai WY, Chang WH, Chen CH, Lu FJ. Enhancing effect of patented whey protein isolate (Immunocal) on cytotoxicity of an anticancer drug. *Nutr Cancer* 2000; 38(2): 200-8.

Tsuda H, Sekine K, Nakamura J, Ushida Y, Kuhara T, Takasuka N, Kim DJ, Asamoto M, Baba-Toriyama H, Moore MA, Nishino H, Kakizoe T. Inhibition of azoxymethane initiated colon tumor and aberrant crypt foci development by bovine lactoferrin administration in F344 rats. *Adv Exp Med Biol* 1998; 443:273-284.

Udenigwe CC, Aluko RE. Antioxidant and angiotensin converting enzyme-inhibitory properties of a flaxseed protein-derived high Fischer ratio peptide mixture. *J Agric Food Chemistry* 2010; 58(8): 4762-8.

United States Pharmacopeial. United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 30-NF 25). Rockville, MD: United States Pharmacopeia Convention; 2007.

Valduga E, Paviani LC, Mazur SP, Finzer JRD. Aplicação do soro de leite em pó na panificação. *Alim Nut* 2006; 17(4):393-400.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Tesler J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 44-84.

Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JBF, Manfredini V, Benfato MS, Kubota LT. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Quim Nova* 2007; 30(5): 1323-1338.

Velaphi SC, Cooper PA, Bolton KD, Mokhachane M, Mphahlele RM, Beckh-Arnold E, Monaheng L, Haschke-Becher E. Growth and metabolism of infants born to women infected with human immunodeficiency virus and fed acidified whey-adapted starter formulas. *Nutrition* 2008; 24(3): 203-11.

Ven C, Gruppen H, Bont DBA, Voragen AGJ. Reversed-phase and size exclusion chromatography of milk protein hydrolysates: relation between elution from reversed phase column and apparent molecular weight distribution. *Int Dairy J* 2001; 11(1-2): 83-92.

Vermeirssen V, Camp JV, Verstraete W. Optimisation and validation of an angiotensin-converting enzyme inhibition assay for the screening of bioactive peptides. *J Biochem Biophys Methods* 2002; 51: 75-87.

Visser S, Slangen CJ, Robben AJPM. Determination of molecular mass distributions of whey protein hydrolysates by high-performance size-exclusion chromatography. *J Chromat A* 1992; 599(1-2): 205-9.

Wallace JM, Fox PF. Rapid spectrophotometric and fluorimetric methods for monitoring nitrogenous (proteinaceous) compounds in cheese and cheese fractions: a review. *Food Chem* 1998; 62(2): 217-24.

Walzen RL, Dillard CJ, German JB. Whey components: millennia of evolution create functionalities for mammalian nutrition: what we know and what we may be overlooking. *Crit Rev Food Sci Nut.* 2002; 42(4): 353-75.

Wang H, Zhang F, Cao J, Zhang Q, Chen Z. Comparison of chromatographic and titrimetric methods for the determination of the α -amino nitrogen in standard solution and fish protein hydrolysates. *J Food Res* 2012; 1(4): 174-83.

Wang JZ, Zhang H, Zhang M, Yao WT, Mao XY, Ren FZ. Antioxidant activity of hydrolysates and peptide fractions of porcine plasma albumin and globulin. *J Food Biochem* 2008; 32: 693-707.

Wang JZ, Zhao M, Jiang Y. Effects of wheat gluten hydrolysate and its ultrafiltration fractions on dough properties and bread quality. *Food Technol Biotechnol* 2007; 45(4): 410-4.

Wang L, Mao X, Cheng X, Xiong X, Ren F. Effect of enzyme type and hydrolysis condition on the *in vitro* angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity and ash content of hydrolysed whey protein isolate. *Int J Food Sci Technol* 2010; 807-812.

Watanabe A, Okada K, Shimizu Y, Wakabayashi H, Higuchi K, Niiya K, Kuwabara Y, Yasuyama T, Ito H, Tsukishiro T, Kondoh Y, Emi N, Kohri H. Nutritional therapy of chronic hepatitis by whey protein non-heated. *J Med* 2000; 31(5-6): 283-302.

Whitaker JR, Voragen AGJ, Wong DWS. (ed.). *Handbook of food enzymology*. New York: Marcel Dekker, 2003.

Wobeto VPA, Zaccariotto TR, Sonati MF. Polymorphism of human haptoglobin and its clinical importance. *Genetics Mol Biol*. 2008; 31(3): 602-620.

World Health Organization. Protein and amino acid requirements in human nutrition: report of a joint FAO/WHO/UNU expert consultation. Geneva: WHO; 2002. (WHO. Technical Report). [acesso em 12 jun 2010]. Disponível em: <http://www.who.int/nutrition/publications/nutrecomm/en/index.html>.

Wu J, Ding X. Characterization of inhibition and stability of soy-protein-derived angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides. *Food Res Int* 2002; 35: 367-75.

Wu H. A new colorimetric method for the determination of plasma proteins. *J Biol Chem* 1922; 51: 33-9.

Xiao X, Luo X, Chen B, Yao S. Determination of angiotensin converting enzyme inhibitory activity by high-performance liquid chromatography/electrospray-mass spectrometry. *J Chromatogr B* 2006; 834: 48-54.

Xu M, Shanguan X, Wang W, Chen J. Antioxidative activity of hen egg ovalbumin hydrolysates. *Asia Pac J Clin Nutr* 2007; 16(suppl 1): 178-182.

Yoo YC, Watanabe S, Watanabe R, Hata K, Shimazaki K, Azuma I. Bovine lactoferrin and lactoferricin inhibit tumor metastasis in mice. *Adv Exp Med Biol* 1998; 443:285-291.

Yoshida, T. Peptide separation by hydrophilic-interaction chromatography: a review. *J Biochem Biophys Methods* 2004; 60(3): 265-80.

You L, Zhao M, Cui C, Zhao H, Yang B. Effect of degree of hydrolysis on the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates. *Innov Food Sci Emerg Technol* 2009; 10: 235-40.

You L, Zhao M, Regenstein JM, Ren J. Changes in the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates during a simulated gastrointestinal digestion. *Food Chem* 2010; 120: 810-6.

Zahou E, Jörnval H, Bergman T. Amino acid analysis by capillary electrophoresis after phenylthiocarbamylation. *Anal Biochem* 2000; 281(1): 115-22.

Zaia DAM, Zaia CTBV, Lichtig J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. *Quim Nova* 1998; 21(6): 787-93.

Zambrowicz a, Pokora m, Eckert E, Szoltysik M, Dąbrowska A, Chrzanowska J, Trziszka T. Antioxidant and antimicrobial activity of lecithin free egg yolk protein preparation hydrolysates obtained with digestive enzymes. *Func Foods Health Dis* 2012; 2(12): 487-500.

Zanoti MDU, Pina JC, Manetti ML. Correlação entre pressão arterial e peso em crianças e adolescentes de uma escola municipal do noroeste paulista. Zanoti MDU, Pina JC, Manetti ML *Esc Anna Nery Rev Enferm* 2009; 13 (4): 879-85.

Zavareze ER, Moraes KS, Leite NGS, Salas-Melado MM. Efeito do soro de leite no teor proteico e na qualidade tecnológica de pães. *Rev Inst Latic Cândido Tostes* 2012; 63(363): 44-50.

Zavareze ER, Moraes KS, Salas-Melado MM. Qualidade tecnológica e sensorial de bolos elaborados com soro de leite. *Cienc Tecnol Alim* 2010; 30(1): 100-5.

Zeece M, Huppertz T, Kelly A. Effect of high-pressure treatment on in-vitro digestibility of β -lactoglobulin. *Innov Food Sci Emer* 2008; 9(1): 62-9.

Zemel MB. Mechanisms of dairy modulation of adiposity. *J Nutr* 2003; 133(1):252S-6S.

Zemel MA. Role of calcium and dairy products in energy partitioning and weight management. *Am J Clin Nutr* 2004; 79(5): 907s-12s.

Zhang QX, Ling YF, Sun Z, Zhang L, Yu HX, Kamau SM, Lu RR. Protective effect of whey protein hydrolysates against hydrogen peroxide-induced oxidative stress on PC12 cells. *Biotechnol Lett* 2012; 34(11): 2001-6.

Zhang X, Beynen A. Lowering effect of dietary milk-whey protein vs. casein on plasma and liver cholesterol concentrations in rats. *Br J Nutr* 1993; 70(1):139-46.

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/TOFMS/MS. *Food Chem* 2010; 119: 226-34.

Zhao X, Hou Y. Limited hydrolysis of soybean protein concentrate and isolate with two proteases and the impact on emulsifying activity index of hydrolysates. *African J Biotechnol* 2009; 8(14): 3314-9.

Zheng H, Zhang C, Cao W, Liu S, Ji H. Preparation and characterization of the pearl oyster (*Pinctada martensii*) meat protein hydrolysates with a high Fischer ratio. *Int J Food Sci Technol* 2009; 44(6): 1183-91.

Zhu BY, Mant CT, Hodges RS. Hydrophilic-interction chromatography of peptides on hydrophilic and strong cation-exchange columns. *J Chromat* 1991; 558(1): 13-24.

Ziegler FF, Castro GA, Moreno YMF, Oya V, Vilela MMS, Sgarbieri VC. Partial chemical and functional characterization of milk whey products obtained by different processes. *Cienc Tecnol Aliment* 2012; 32(1): 56-64.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Otimizar a obtenção de hidrolisados proteicos, a partir do soro de leite (WPC), de forma que apresentem propriedades bioativas capazes de reduzir os fatores de risco associados ao sobrepeso ou à obesidade na infância, especialmente no que diz respeito às atividades anti-hipertensiva e antioxidante.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar quimicamente o concentrado protéico de soro de leite (*whey protein concentrate* - WPC).
- Preparar hidrolisados enzimáticos de WPC, empregando diferentes enzimas e condições de reação.
- Comparar diferentes metodologias para avaliar o grau de hidrólise dos hidrolisados proteicos.
- Caracterizar o perfil peptídico dos hidrolisados proteicos de soro de leite, de acordo com o tamanho da cadeia peptídica.
- Correlacionar o grau de hidrólise das proteínas hidrolisadas com o perfil peptídico.
- Avaliar a atividade anti-hipertensiva dos hidrolisados proteicos.
- Avaliar a atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos.

4 MÉTODOS

4.1 Determinação da composição química do concentrado proteico do soro de leite

A composição química do concentrado proteico do soro de leite (WPC) foi determinada segundo os métodos descritos na *Association of Official Analytical Chemists* (Horwitz; Latimer Jr., 2007), sendo todas as análises realizadas em triplicata. A umidade foi determinada pelo método de secagem em estufa ventilada (Quimis Q-314M242, série 020, Diadema, SP, Brasil) a 105 °C até peso constante; as cinzas, por incineração, em mufla (MDS, Fornitec, São Paulo, SP, Brasil) a 550 °C; os lipídeos, por extração com éter etílico (Soxhlet modificado, Quimis Q-308G26, série 018, Diadema, SP, Brasil); as proteínas foram determinadas pelo método de micro-Kjeldahl (bloco digestor modelo MA4025 e destilador de nitrogênio modelo MA036, Marconi, Piracicaba, SP, Brasil), empregando o fator de conversão de nitrogênio para proteína de 6,38. A lactose foi quantificada por determinação de glicídios redutores em lactose (Instituto Adolfo Lutz, 2008).

4.2 Preparo dos hidrolisados enzimáticos de WPC

Em um primeiro momento, foram preparados vinte e quatro hidrolisados enzimáticos, variando-se o tipo de enzima e a relação enzima:substrato - E:S (v/v). As condições empregadas no preparo destes hidrolisados estão apresentadas na Tabela 7, sendo que os valores de pH e temperatura correspondem aos ótimos fornecidos pelo fabricante das enzimas.

As soluções a 10 g% (p/v) de concentrado proteico de soro de leite foram preparadas em água tipo I, correspondendo a 3,42% (p/v) de proteína, sendo o pH ajustado para 7,0 ou 8,0, com solução de NaOH a 3 mol.L⁻¹. Posteriormente, foram aquecidas em banho de vaselina, sob agitação constante em agitador magnético (modelo 752A, Fisatom, São Paulo, SP, Brasil), seguida da adição das enzimas em quantidades adequadas para se obter a relação E:S desejada. O tempo total de hidrólise foi de 5 horas e, após este período, as enzimas foram inativadas por aquecimento em banho-maria a 75 °C, por 15 segundos. As amostras foram liofilizadas (Freeze Dry System/FreeZone 4,5, model 77500, LABCONCO, Kansas City, Estados Unidos) e armazenadas em freezer até o momento do uso.

No segundo momento, foram preparados outros vinte hidrolisados enzimáticos, conforme descrito no parágrafo anterior, sendo que nesta fixou-se a relação E:S em 8,0:100, e

variando-se o tipo de enzima e o tempo de hidrólise (uma a cinco horas), conforme apresentado na tabela 8.

Tabela 7 - Parâmetros empregados no preparo dos hidrolisados do concentrado proteico do soro de leite, em diferentes valores de relação enzima:substrato.

Hidrolisados	Tipo de enzima	E:S	pH	Temperatura
H1 H2 H3 H4 H5 H6	Protease de <i>Bacillus licheniformis</i>	0,5:100 1,0:100 2,0:100 3,0:100 4,0:100 8,0:100	8,0	60 °C
H7 H8 H9 H10 H11 H12	Protease de <i>Aspergillus oryzae</i>	0,5:100 1,0:100 2,0:100 3,0:100 4,0:100 8,0:100	7,0	50 °C
H13 H14 H15 H16 H17 H18	Protease de <i>Aspergillus sojae</i>	0,5:100 1,0:100 2,0:100 3,0:100 4,0:100 8,0:100	7,0	50 °C
H19 H20 H21 H22 H23 H24	Pancreatina	0,5:100 1,0:100 2,0:100 3,0:100 4,0:100 8,0:100	7,0	50 °C

E:S = relação enzima:substrato

Tabela 8 - Parâmetros empregados no preparo dos hidrolisados do concentrado proteico do soro de leite, em diferentes tempos de reação.

Hidrolisados	Tipo de enzima	Tempo de hidrólise (horas)	pH	Temperatura
H1 H2 H3 H4 H5	Protease de <i>Bacillus licheniformis</i>	1 2 3 4 5	8,0	60 °C
H6 H7 H8 H9 H10	Protease de <i>Aspergillus sojae</i>	1 2 3 4 5	7,0	50 °C
H11 H12 H13 H14 H15	Protease de <i>Aspergillus sojae</i>	1 2 3 4 5	7,0	50 °C
H16 H17 H18 H19 H20	Pancreatina	1 2 3 4 5	7,0	50 °C

4.3 Caracterização do perfil peptídico dos hidrolisados do concentrado proteico do soro de leite

Esta análise foi utilizada para todos os hidrolisados preparados conforme apresentado nas tabelas 7 e 8. Assim, a caracterização do perfil peptídico foi realizada em duas etapas: fracionamento dos peptídeos, de acordo com o tamanho da cadeia, e sua posterior quantificação. O fracionamento dos peptídeos foi realizado por cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular (CLAE-EM) em coluna poli-(2-hidroxietil-aspartamida)-sílica (PHEA) de 250 mm x 9,4 mm, 5 µm e 200 Å (PolyLC, Columbia, MD, EUA), conforme método desenvolvido pela coordenadora desta pesquisa (Silvestre; Hamon; Yvon, 1994a). As amostras foram dissolvidas em concentração de 1 g% (p/v) na fase móvel (ácido fórmico a 0,05 mol.L⁻¹, pH 2,5), filtradas através de membranas de 0,22 µm e submetidas à cromatografia à temperatura ambiente, sob condições isocráticas, em fluxo de 0,5 mL.min⁻¹, durante 35 min. O volume de amostra injetado foi de 50 µL. A fase móvel foi filtrada através

de membrana de 0,45µm e desgaseificada em ultrassom (modelo USC1400, UNIQUE, Santo Amaro, Brasil), sob vácuo, por 30 minutos.

O método rápido da Área Corrigida da Fração (ACF) (Silvestre; Hamon; Yvon, 1994b) foi utilizado para quantificar os peptídeos e aminoácidos livres presentes nos hidrolisados do soro de leite, após a multidetecção das frações a 230 nm, 280 nm e 300 nm. Resumidamente, foram preparados cinco hidrolisados padrão (dois com tripsina e três com pancreatina) os quais foram fracionados por CLAE-EM em coluna PHEA. As quatro frações obtidas foram coletadas (Coletor de frações, modelo CF-1, Spectrum Chrom, Houston, TX, EUA), sendo o solvente removido de cada fração em evaporador Centrivap (modelo 78100-00D, LABCONCO, Kansas City, MO, EUA). Posteriormente, as frações foram submetidas à análise de aminoácidos. O cálculo da ACF foi realizado por meio de fórmulas, após a multidetecção das frações a 230 nm, 280 nm e 300 nm, para se eliminar a interferência devida à absorção dos aminoácidos aromáticos. Traçou-se, então, uma curva plotando-se a ACF em função do teor de aminoácidos.

4.4 Determinação do grau de hidrólise (GH)

O grau de hidrólise das amostras preparadas, conforme apresentado na tabela 8, foi calculado por meio de quatro metodologias diferentes, baseadas na determinação do teor de nitrogênio α -aminado (titulação com formol e derivatização com ortoftaladeído), na depressão do ponto de congelamento (osmometria) ou na quantificação do teor de proteína solúvel após a precipitação com ácido tricloroacético.

4.4.1 Titulação com formol

O grau de hidrólise foi calculado por meio da relação entre o nitrogênio α -aminado (NA) e o nitrogênio total (NT) de acordo com a Equação 1.

$$\text{GH (\%)} = \frac{\text{nitrogênio } \alpha\text{-aminado} \times 100}{\text{nitrogênio total da amostra}} \quad (1)$$

Para a determinação do NA utilizou-se o método de titulação com formol. Dessa forma, um volume de 3 mL da amostra foi adicionado a um mesmo volume de solução de

formaldeído-fenoltaleína. Após ajuste do pH para 7,0, usando uma solução de NaOH a 0,2 mol.L⁻¹ padronizada, a amostra foi titulada com esta mesma solução até viragem de cor, sendo, em seguida, adicionado um excesso, equivalente ao volume titulado, dessa mesma solução. Então, fez-se uma retro-titulação com uma solução de HCl a 0,2 mol.L⁻¹ padronizado. O teor de NT foi determinado pelo método de Kjeldahl. Todas as análises foram realizadas de acordo com a *Association of Official Analytical Chemists* (1995).

4.4.2 Derivatização com ortoftaldeído (OPA)

Para esta análise, o reagente OPA foi preparado de acordo com Church et al. (1983). Assim, misturou-se 25 mL de solução de tetraborato de sódio (100 mmol.L⁻¹), com 2,5 mL de solução de dodecil-sulfato de sódio a 20% (p/v) e 40 mg de OPA (dissolvido em 1 mL de metanol) e 100 µL de 2-mercaptoetanol, sendo o volume completado para 50 mL, empregando-se água do tipo I. O reagente era sempre preparado imediatamente antes do uso e colocado em frasco coberto com papel alumínio para protegê-lo da luz.

Para a reação de derivatização, empregou-se o método de Spellman et al. (2003), com algumas modificações. Assim, 10 µL de amostra foram misturados a 3,4 mL do reativo do OPA, sendo esta mistura deixada em repouso, a 25 °C, por dois minutos. Em seguida, foi realizada a leitura da absorvância a 340 nm. O grau de hidrólise foi calculado de acordo com a equação 2.

$$GH (\%) = \frac{(ABS \times 1,934 \times d)}{c} \quad (2)$$

Onde, ABS é a absorvância das amostras; 1,934 é o fator de correção da absorvidade das proteínas do soro de leite; d é o fator de diluição; e c, a concentração proteica da amostra (g.L⁻¹) (Spellman et al. 2003)

4.4.3 Osmometria

Para esta análise, 50 µL de cada amostra foram imediatamente retirados após o término da reação para determinação do ponto de congelamento, o qual foi medido usando um micro-osmômetro (Precision Systems 5004, Spectrun, São Paulo, SP, Brasil). A depressão do ponto de congelamento foi empregada para determinar o grau de hidrólise, de acordo com a equação 3, proposta por Adler-Nissen (1986).

$$\text{GH} (\%) = \left(\frac{\Delta C}{P\% \times f_{\text{osm}}} \right) \times \left(\frac{1}{\omega} \right) \times \left(\frac{1}{h_{\text{tot}}} \right) \times 100 \quad (3)$$

Onde ΔC é a osmolaridade (mosmol.L^{-1}); $P\%$ é a concentração proteica (g de proteína/kg de água); $1/\omega$ é o fator de calibração do osmômetro, o qual representa o recíproco do coeficiente osmótico dos peptídeos, que se assume ser um valor constante de 1,04; e h_{tot} é o número total de ligações peptídicas na proteína, que para o soro de leite é de $8,8 \text{ mEq.g}^{-1}$ de proteína do soro (Adler-Nissen 1986).

4.4.4 Teor de proteína solúvel em ácido tricloroacético

O grau de hidrólise do WPC foi determinado pela porcentagem de proteína solúvel em ácido tricloroacético (TCA) a 10 g%, em relação ao teor proteico total da amostra, de acordo com Hoyle; Merritt (1994), com modificações. Assim, alíquotas de 500 μL dos hidrolisados foram misturadas com 500 μL de solução de TCA a 20 g%, para obter as frações solúveis e insolúveis em TCA a 10 g%. Após 30 minutos de repouso, a mistura foi centrifugada a 3000 x g, sendo o teor de proteínas solúveis do sobrenadante determinado pelo método de Lowry et al. (1951), modificado por Hartree (1972), e o resultado expresso em mg de proteína, empregando-se a albumina sérica bovina como padrão. O grau de hidrólise foi calculado de acordo com a equação 4:

$$\text{GH} (\%) = \frac{\text{teor de proteína solúvel em TCA a 10g\% (mg)} \times 100}{\text{teor de proteína total (mg)}} \quad (4)$$

4.5 Avaliação *in vitro* da atividade inibitória dos hidrolisados proteicos sobre a enzima conversora de angiotensina

O preparo das amostras para a avaliação da atividade inibitória dos hidrolisados enzimáticos de WPC (tabela 7) sobre a ECA foi realizado de acordo com Wu et al. (2002). Assim, um volume de 12,5 μL de solução de hipuril-histidil-leucina - HHL ($2,17 \text{ mmol.L}^{-1}$) foi misturado com 50 μL das soluções de hidrolisados (10 mg.mL^{-1}), ambas preparadas em tampão borato a 100 mmol.L^{-1} , contendo solução de NaCl a 300 mmol.L^{-1} , em pH 8,3, e a

mistura foi incubada a 37 °C por 10 minutos. Um volume de 200 µL de ECA (4 mU), preparada no mesmo tampão, foi submetido a este mesmo tratamento. Em seguida, as soluções foram misturadas e, após a incubação a 37 °C por 30 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 125 µL de HCl (1,0 mol.L⁻¹). A mistura foi, então, filtrada em membrana de 0,22 µm, para a análise por CLAE-FR. Soluções padrão de ácido hipúrico (AH), em concentrações variando de 0,05 a 7,25 mmol.L⁻¹, também foram submetidas a este mesmo tratamento, para a construção de uma curva de calibração.

A medida da atividade inibitória da ECA foi baseada na liberação de ácido hipúrico, como proposto por Cushman; Cheung (1971), o qual foi quantificado por CLAE-FR, nas condições cromatográficas propostas por Yu et al. (2006). Assim, as amostras foram analisadas em coluna GraceSmart RP-18 de 150 x 4,6 mm, 5 µm e 120 Å (Grace Davison, Deerfield, IL, EUA), sendo o AH e o HHL detectados a 228 nm. A eluição ocorreu a um fluxo isocrático de 0,8 mL.min⁻¹, com fase móvel sendo composta de metanol (30%), ácido trifluoroacético (0,1%) e ácido acético (0,05%). Para a realização das análises, foram injetados 50 µL de amostra, na temperatura de 25 °C, com tempo de corrida de 10 minutos.

A atividade inibitória da ECA foi expressa de duas maneiras, ou seja, em percentual de inibição e como valor IC₅₀, definido como a concentração de hidrolisados (mg.mL⁻¹) requerida para inibir 50% da atividade enzimática.

4.6 Avaliação *in vitro* da atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos

Neste trabalho, a atividade antioxidante dos hidrolisados (tabela 7) foi avaliada por meio de três metodologias diferentes, baseadas na redução de radicais livres pela transferência de elétrons (método do 2,2-difenil-1-picril-hidrazila - DPPH), na habilidade dos diferentes compostos em sequestrar radicais hidroxila (método da desoxirribose) ou superóxido (método da auto-oxidação pirogalol).

4.6.1 Método do DPPH

Nesta etapa, foi empregada a metodologia descrita por Li et al. (2006), com modificações. Assim, 1,5 mL das soluções de hidrolisados (100 mg.mL⁻¹) foi misturado a 1,5 mL de solução alcoólica de DPPH (0,1 mmol.L⁻¹), e as misturas deixadas em repouso a 25 °C, por 20 minutos. Em seguida, as misturas foram incubadas em banho-maria, até atingirem

60 °C, mantendo-se esta temperatura por 20 minutos. Posteriormente, procedeu-se a medida da absorvância em espectrofotômetro (modelo SP-2000UV, Bel Photonics, Osasco, São Paulo, Brasil) a 517 nm. Uma mistura de 1,5 mL de DPPH e 1,5 mL de água destilada foi usada como controle.

A atividade antioxidante das soluções de hidrolisados, expressa como a porcentagem de sequestro dos radicais DPPH (%SR), foi calculada pela equação:

$$\text{Atividade antioxidante (\%SR)} = (\text{AC} - \text{AH}) / \text{AC} \times 100$$

Onde, AC e AH são as absorvâncias da amostras controle e das amostras contendo soluções de hidrolisados, respectivamente.

4.6.2 Método da desoxirribose

Para avaliar a atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos de WPC contra radicais hidroxilas (OH•-), foi empregado o método de oxidação da α -desoxirribose, proposto por Halliwell et al. (1987), com algumas modificações. Assim, um volume de 0,2 mL de solução de FeSO₄ (10 mmol.L⁻¹) foi misturado com 0,2 mL das soluções de hidrolisados (100 mg.mL⁻¹), por 5 minutos. Em seguida, adicionou-se 1,0 mL de solução de α -desoxirribose (10 mmol.L⁻¹), 2,2 mL de solução tampão fosfato de sódio (0,01 mol.L⁻¹, pH 7,4) e 0,4 mL de solução de peróxido de hidrogênio (10 mmol.L⁻¹). A mistura foi incubada a 37 °C por 60 minutos e, logo após, adicionou-se 1,0 mL de ácido tricloracético (2,8 g% p/v) e 1,0 mL de ácido tiobarbitúrico (0,8 g% p/v). Finalmente, os tubos foram aquecidos a 100 °C por 15 minutos, resfriados à temperatura ambiente e centrifugados a 4 472 x g por 15 minutos (centrífuga NT812-Nova Técnica, Piracicaba, São Paulo, Brasil). A absorvância do pigmento vermelho no sobrenadante foi medida no espectrofotômetro, a 532 nm (modelo SP-2000UV, Bel Photonics, Osasco, São Paulo, Brasil), sendo uma mistura preparada sem os hidrolisados empregada como controle.

A atividade antioxidante dos hidrolisados contra os radicais hidroxilas foi avaliada como a porcentagem de inibição da oxidação da α -desoxirribose, de acordo com a fórmula abaixo.

$$\text{Atividade antioxidante (\% inibição)} = (\text{AC} - \text{AH}) / \text{AC} \times 100$$

Onde, AC e AH são as absorvâncias da amostra controle e das amostras contendo soluções de hidrolisados, respectivamente.

4.6.3 Método da auto-oxidação do pirogallol

A habilidade dos hidrolisados em sequestrar os radicais superóxidos foi avaliada pelo método da auto-oxidação do pirogallol, proposto por Marklund; Marklund (1974), com modificações propostas por Tang et al. (2010). Assim, uma mistura contendo 2,8 mL de solução-tampão Tris/HCL (50 mmol.L⁻¹, pH 8,2), 0,1 mL de soluções de hidrolisados (100 mg.mL⁻¹) e 0,1 mL de solução de pirogallol (10 mmol.L⁻¹) dissolvido em HCl (10 mmol.L⁻¹), foi incubada a 25 °C por 10 minutos. Em seguida, a auto-oxidação do pirogallol foi acompanhada em espectrofotômetro (modelo SP-2000UV, Bel Photonics, Osasco, São Paulo, Brasil) a 420 nm, em intervalos de 30 segundos, durante 5 minutos, sendo uma mistura preparada sem os hidrolisados empregada como controle. Em seguida, foram traçadas curvas de absorvância em função do tempo, sendo a inclinação das retas consideradas como a taxa de oxidação do pirogallol.

A atividade antioxidante dos hidrolisados contra radicais superóxidos foi expressa como a porcentagem de inibição da auto-oxidação do pirogallol, de acordo com a fórmula abaixo.

$$\text{Atividade antioxidante (\% inibição)} = (AC - AH) / AC \times 100$$

Onde, AC e AH são as taxas de oxidação do pirogallol da amostra controle e das amostras contendo soluções de hidrolisados, respectivamente.

4.7 Análise estatística

No caso da caracterização do perfil peptídico, no estudo da atividade inibitória da ECA e na avaliação da atividade antioxidante, adotou-se o delineamento inteiramente casualizado, em esquema de análise fatorial (enzimas x relações enzima:substrato ou enzimas x tempos de hidrólise), sendo os resultados analisados com o software Statistica (Stat Soft, 2000). Com relação ao grau de hidrólise, aplicou-se o delineamento inteiramente casualizado,

em esquema de análise *spli-splot* (4 métodos x 6 tempos de hidrólise), sendo os resultados analisados com o software SISVAR versão 5.3 (Ferreira, 2010).

Para todos os experimentos, realizou-se a análise de variância e o teste de Duncan a 5% de probabilidade, que foram empregados para determinar as diferenças entre as médias de triplicatas dos percentuais do grau de hidrólise (Pimentel-Gomes, 2000).

Para o grau de hidrólise, analisaram-se também as correlações entre os resultados obtidos pelas diferentes metodologias e destes com os teores de peptídeos e de aminoácidos livres, pelo coeficiente de correlação de Pearson (r), sendo o valor de p determinado pelo teste t-Student, empregando-se o software Bioestat (Ayres, 2007) para a análise dos dados. Este mesmo teste também foi aplicado para avaliar a correlação entre os valores da atividade antioxidante medidos pelas distintas técnicas neste estudo.

4.8 Referências

Adler-Nissen J. Enzymic hydrolysis of food proteins. London: Elsevier Applied Science, 1986. 426p.

Association of Official Agricultural Chemists. Official methods of analysis of AOAC international. 16 ed. Arlington: AOAC International, 1995. 2v.

Ayres M, Ayres Jr M, Ayres DL, Santos AAS. BioEstat: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém, PA: Sociedade Civil Mamirauá, MCT-CNPq, 2007. Disponível em: <<http://www.mamiraua.org.br/downloads/programas>>. Acesso em 15 mar. 2012.

Church FC, Swaisgood HE, Porter DH, Catignani GH. Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. J Dairy Sci 1983; 66: 1219-27.

Cushman DW, Cheung H. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin converting enzyme of rabbit lung. Biochem Pharmacol 1971; 20: 1637-48.

Ferreira DF. SISVAR versão 5.3 (build 75). Lavras: DEX/UFLA, 2010.

Halliwell B, Gutteridge JMC, Aruoma OI. The deoxyribose method: a simple “test-tube” assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. Anal Biochem 1987; 165: 215-219.

Hartree EF. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. Anal Biochem 1972; 48: 422-7.

Hoyle NT, Merritt JH. Quality of fish protein hydrolysates from herring (*Clupea harengus*). J Food Sci 1994; 59: 76-9.

Horwitz W, Latimer Jr GW. (ed.). Official methods of analysis of AOAC International. 18th.ed. Gaithersburg: AOAC International, 2007.

Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1020p.

Li L, Wang J, Zhao M, Cui C, Jiang Y. Artificial neural network for production of antioxidant peptides derived from bighead carp muscles with alcalase. *Food Technol Biotechnol* 2006; 44(3): 441-448.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-75.

Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 1974; 47: 469-474.

Pimentel-Gomes F. Curso de estatística experimental. 14. ed. Piracicaba: Livraria Nobel, 2000.

Silvestre MPC, Hamon M, Yvon M. Analyses of protein hydrolysates. 1. Use of poly (2-hydroxyethyl-aspartamide)-silica column in size-exclusion chromatography for the fractionation of casein hydrolysates. *J Agric Food Chem* 1994a; 42(12): 2778-82.

Silvestre MPC, Hamon M, Yvon M. Analyses of protein hydrolysates. 2. Characterization of casein hydrolysates by a rapid peptide quantification method. *J Agric Food Chem* 1994b; 42(1): 2783-89.

Spellman D, McEvoy E, O'Cuinn G, Fitzgerald RJ. Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: comparison of the TNBS, OPA e pH-stat method for quantification of degree of hydrolysis. *Int Dairy J* 2003; 13: 447-53.

Statsoft, Inc. STATISTICA for Windows [Computer program manual]. Tulsa: StatSoft Inc., 2000.

Tang X, He Z, Dai Y, Xiong YL, Xie M, Chen J. Peptide fractionation and free radical scavenging activity of zein hydrolysate. *J Agric Food Chem* 2010; 58: 587-593.

Wu J, Aluko RE, Muir AD. Improved method for direct high-performance liquid chromatography assay of angiotensin-I-converting enzyme-catalyzed reactions. *J Chromat A* 2002; 950: 125-30.

Yu Y, Hu J, Bai X, Du Y, Lin B. Preparation and function of oligopeptide-enriched hydrolysate from globin by pepsin. *Process Biochem* 2006; 41: 1589-93.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Hidrólise enzimática do concentrado proteico de soro de leite: efeitos do tipo de enzima e da relação enzima:substrato no perfil peptídico

Enzymatic hydrolysis of whey protein concentrate: effect of enzyme type and enzyme:substrate ratio on peptide profile

Enzymatic Protein Hydrolysates

Harriman Aley Morais^a, Marialice Pinto Coelho Silvestre^{bc*}, Mauro Ramalho Silva^c, Viviane Dias Medeiros Silva^c, Marina Andrade Batista^b, Ana Cristina Simões e Silva^b, Josiane Niccácio Silveira^b

^a Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, MG, Brazil.

^b Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.

^c Edetec Indústria Alimentícia S/A, Belo Horizonte, MG, Brazil.

* Corresponding author:

Dr. Marialice Pinto Coelho Silvestre

Credentials: Food Science, PhD, Edetec Indústria Alimentícia S/A

Postal Address: Av. José Cândido da Silveira, 2100, CEP 31.035-536, Belo Horizonte, MG, Brazil.

Phone: +55 – 31 – 3486-4167 – Fax: 486-1619

E-mail: malice@ufmg.br

ABSTRACT

The enzymatic hydrolysis of whey protein concentrate was used to prepare hydrolysates with appropriate peptide profiles for use in the development of dietary supplements. The effects of the type of enzyme (pancreatin and proteases from *Bacillus licheniformis*, *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus sojae*) and enzyme:substrate ratio (0.5:100, 1:100, 2:100, 3:100, 4:100 and 8:100) were evaluated. Twenty-four hydrolysates were prepared, and their peptide profiles were characterized by chain length using size exclusion liquid chromatography fractionation, followed by a rapid Correct Fraction Area method for quantifying the peptide and amino acid contents. The use of a protease from *Bacillus licheniformis* (E:S 8:100) and a pancreatin (E:S 2:100, 3:100, 4:100 and 8:100) yielded preparations of hydrolysates with the highest sums of di- and tripeptide and free amino acid contents (9.99% and 11.28% for the protease from *Bacillus licheniformis* and pancreatin, respectively) as well as the lowest amount of large peptides (44.61% and 44.13%, respectively).

Keywords: whey protein concentrate; enzymatic hydrolysis; *Bacillus licheniformis*; *Aspergillus oryzae*; *Aspergillus sojae*; pancreatin.

1. Introduction

Whey is defined as a byproduct of cheese-making or casein production in the dairy industry. It constitutes approximately 85–90% of the milk volume and retains approximately 55% of the milk ingredients (Sinha et al. 2007). However, due to its high organic substance content, especially the prevalence of lactose (approximately 75% of the total whey solids), which is responsible for its high biological and chemical oxygen demands, it is considered one of the most polluting food by/co-product streams (Moreno-Indias et al. 2009). In spite of this, whey is considered a valuable product because of its soluble proteins and its high levels of essential amino acids, B vitamins, lactose and salts (Barbosa et al. 2010).

Although whey is a source of ingredients with significant biological value, its use *in natura* is limited because of its perishable components and the excessive dilution of its components. However, certain membrane separation technologies can be used to partially concentrate the whey, giving rise to whey protein concentrate (WPC), which consists of 35-80% proteins (Brans et al. 2004).

The nutritional value of whey proteins should be stressed due to their great biological value and amino acid composition. Whey proteins contain a significant amount of some essential (tryptophan, lysine, threonine, methionine and isoleucine) and sulfur-containing amino acids (cysteine and methionine) (Sinha et al. 2007), the amount of which is higher than the amino acid requirements established by the World Health Organization for infants, children and adolescents (WHO 2002). In addition, it is known that many of these amino acids have specific biological properties, *i.e.*, they participate in biochemical pathways and are precursors of active metabolites (Korhonen and Pihlanto 2006).

With the purpose of increasing the use of WPC proteins, enzymatic hydrolysis can be used to produce protein hydrolysates with different free amino acid and peptide profiles, depending on the enzyme specificities. These protein hydrolysates may have several applications in special foods, such as those designed to provide nutritional support to individuals with particular physiological and nutritional needs not covered by conventional diets (Pacheco et al. 2002). Protein hydrolysates have been used as main ingredients of geriatric products, high-energy supplements, hypoallergenic formulas, as well as parenteral and enteral solutions. Additionally, these hydrolysates are used in formulas designed for premature newborns and children with acute or chronic diarrhea, food intolerances, or inborn errors of metabolism, such as phenylketonuria and cystic fibrosis (Silvestre et al. 2011).

Aiming at using a protein hydrolysate for dietetic purpose, a characterization regarding the size distribution of peptides is needed, because the length of the peptide chain influences the rate of absorption. Regarding this subject, several chromatographic techniques have been described in the literature, but they have shown some drawbacks, such as interactions between the solute and the stationary phase and inefficiency in separating small peptides (Silvestre et al. 2011). For these reasons, our group (Silvestre et al., 1994a, b) has developed a method based on the fractionation of peptides by size exclusion high performance liquid chromatography which allowed separating and quantifying peptides with molecular masses smaller than 1,000 Da, and this technique was employed in the current work.

To the author's knowledge, the current work represents the first time a quantity of enzyme up to 8% was used to prepare whey protein enzymatic hydrolysates, employing several protease preparations either purified (microbial enzymes) or in crude form (pancreatin).

With the aim of using enzymatic protein hydrolysates from WPC in dietary supplements for different clinical applications, the goal of the present study was to optimize WPC hydrolysis by evaluating the effect of the enzyme type and the enzyme:substrate ratio to obtain appropriate peptide profiles from a nutritional point of view.

2. Material and Methods

2.1. Material

WPC (Kerrylac 750) in powder form was kindly furnished by Kerry of Brazil Ltda. (Três Corações, MG, Brazil). Pancreatin (Corolase PP® from porcine pancreas, activity = 5.97 U mL⁻¹) and proteases from *Aspergillus sojae* (Corolase LAP®, activity = 0.63 U mL⁻¹), *Bacillus licheniformis* (Alcalase®, activity = 6.22 U mL⁻¹) and *Aspergillus oryzae* (Flavourzyme®, activity = 0.69 U mL⁻¹) was kindly furnished by AB Enzymes (Barueri, SP, Brazil). In this study, one unit protease (U mL⁻¹) activity was defined as the activity that liberates 1 µg of tyrosine per minute (µg Tyr x mL⁻¹ min) under described conditions (Dias; Vilela, Silvestre & Schwan, 2008).

Formic acid was purchased from Merck (Whitehouse Station, NJ, USA). The polyvinylidene fluoride membranes (0.22 µm for samples and 0.45 µm for solvents) and the tangential flow filtration system of 10 kDa porosity were purchased from Millipore (São Paulo, SP, Brazil). All solvents used in this study were analytical grade.

The HPLC system used for fractionating protein hydrolysates consisted of one isocratic pump and a UV-Vis detector (1200 Series, Agilent, Santa Clara, CA, USA) coupled to a computer with ChemStation software for LC Systems (Agilent, Santa Clara, CA, USA). A poly(2-hydroxyethylaspartamide)-silica (PHEA) column (250 x 9.4 mm, 5 μ m and 200 Å pore size) was used for HPLC. The water for HPLC was purified by passage through a MilliQ water purification system (Millipore, Billerica, MA, USA).

2.2. Methods

2.2.1. Determination of chemical composition of whey protein concentrate

The chemical composition of the WPC was determined according to the Association of Official Analytical Chemists (Horwitz & Latimer JR., 2007), and all analysis were performed in triplicate. The moisture content was determined using an evaporation method that employed a forced draft oven (Quimis Q-314M242, serial 020, Diadema, SP, Brazil) at 105 °C until a constant weight was observed. The total ash was determined by incineration with a muffle furnace at 550 °C (MDS, Fornitec, São Paulo, SP, Brazil). The total lipid content was determined using a Soxhlet extraction method with ethylic ether (Quimis Q-308G26, serial 018, Diadema, SP, Brazil). The protein content was determined using the micro-Kjeldahl method (digestion apparatus model MA4025 and distillation system model MA036 from Marconi, Piracicaba, SP, Brazil), using a nitrogen to protein conversion factor of 6.38. The lactose content was quantified by the determination of reducing sugars.

2.2.2. Preparation of hydrolysates from whey protein concentrate

Twenty-four hydrolysates from WPC were prepared with (A) Protease from *Bacillus licheniformis*, pH 8, 60°C (H1-H6), (B) Protease from *Aspergillus oryzae*, pH 7, 50°C (H7-H12.), (C) Protease from *Aspergillus sojae*, pH 7, 50°C (H13-H18) and (D) Pancreatin, pH 7, 50°C (H19-H24). The E:S ratios were 0.5, 1, 2, 3, 4 and 8:100 for all enzymes.

The 10% (wt/vol) WPC solutions were prepared in distilled water, which corresponded to 3.42% protein (wt/vol), and the pH was adjusted to 7.0 or 8.0 with a 3 mol L⁻¹ NaOH solution. Then, the WPC solutions were heated in an oil-bath with continuous stirring (stirrer 752A model from Fisatom, São Paulo, SP, Brazil), and the enzymes were added in such a concentration to attain the desired enzyme:substrate ratios. The total reaction

time was 5 h for all samples, and the hydrolytic reaction was stopped by heating at 75 °C for 15 sec, followed by immediately cooling on ice bath until the temperature of 25 °C. The hydrolysates were freeze-dried (Freeze Dry System/FreeZone 4.5, model 77500, LABCONCO, Kansas City, MO, USA) and stored in the freezer (-4 °C) until analysis.

2.2.3. Characterization of peptide profiles from WPC hydrolysates

The characterization of peptide profiles was performed in two stages, which included the fractionation of peptides according to size and their subsequent quantification. The fractionation of WPC hydrolysates was carried out by size exclusion (SE) HPLC on a PHEA column, according to the method previously developed by our group (Silvestre, Hamon & Yvon, 1994a), using 0.05 mol L⁻¹ formic acid (pH 2.5) as the mobile phase, with isocratic conditions at a flow rate of 0.5 mL min⁻¹ for 35 minutes. The samples were dissolved in the mobile phase (0.1% wt/vol) and filtered through a membrane of 0.22 µm, and 50 µL of these solutions were injected onto the column. The mobile phase was filtered through a membrane of 0.45 µm and degassed by sonication in an ultrasound bath (USC1400 model, UNIQUE, Santo Amaro, SP, Brazil) for 30 minutes before use.

The rapid method of Correct Fraction Area (CFA) that was previously developed by our group (Silvestre, Hamon, & Yvon, 1994b) was used for quantifying the peptides and free amino acids in the SE-HPLC fractions of the WPC hydrolysates. Briefly, five whey standard hydrolysates (two using trypsin and three using pancreatin) were prepared and then fractionated into four fractions by SE-HPLC, as described above. The four fractions were collected (Fraction Collector, CF-1 model, Spectrum Chrom, Houston, TX, USA) and submitted to amino acid analysis following solvent removal (Centrивap, 78100-00D model, LABCONCO, Kansas City, MO, USA). The calculation of CFA was performed using specific formulas after detection at three wavelengths (230, 280 and 300 nm) to remove the contribution of aromatic amino acids. A standard curve was drawn to correlate CFA with the amino acid contents of the fractions.

2.2.4. Evaluation of the effects of enzyme type and enzyme:substrate ratio

The effects of enzyme type and enzyme:substrate (E:S) ratio on the peptide profiles of enzymatic hydrolysates from WPC was evaluated in this study. Four enzymes, three of microbial origin (proteases from *Bacillus licheniformis*, *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus* Artigo publicado no *Journal of Food Science and Technology* (DOI 10.1007/s13197-013-1005-z)

sojae) and pancreatin, all with E:S ratios of 0.5:100, 1.0:100, 2.0:100, 3.0:100, 4.0:100 and 8.0:100, were used to prepare the protein hydrolysates.

2.2.5. Statistical analysis

All experiments and measurements were performed in triplicate. A completely randomized factorial design (four enzymes x six E:S ratios) was adopted to investigate the presence of significant effects among the various treatments ($p < 0.05$). The results were analyzed with Statistica software. An analysis of variance was performed to evaluate the peptide and free amino acid contents of chromatographic fractions at each condition, and the Duncan test was applied to establish differences among the means (Pimentel-Gomes, 2000).

3. Results and Discussion

3.1. Chemical composition of WPC

The determination of the chemical composition of WPC is relevant because this concentrate is the raw material that is used to prepare protein hydrolysates. As seen in Table 1, among the measured ingredients, the protein and lactose contents were closest to those reported by other authors or found in our previous studies (Silva et al., 2009; Silvestre et al., 2011). For the other components, the moisture, lipid and ash contents were close to those found in only one prior study from our group (column F for moisture and lipid components and column E for ash (Silva et al. 2009; Silvestre et al. 2011). In addition, the moisture results were in accordance with the WPC furnisher (> 5 g%).

The variations observed in the results shown in Table 2 are most likely due to factors such as the breed of cows, feeding (nutritional and physical form of the diet), room temperature, handling, intervals between milking, milk production and infections of the mammary glands that may influence the milk composition (Brito et al. 2010) and consequently the whey composition.

Another factor to be considered is that there are two whey types, sweet and acid whey, whose compositions depend on the method of cheese manufacturing. Although they have similar protein levels, the former has a higher lactose content, while the second has a higher amount of ash. The use of the different types of whey and of the different methods regarding

its concentration and processing may also interfere in the WPC composition (Whetstine et al. 2005).

3.2. Chromatographic patterns of protein hydrolysates

The SE-HPLC technique used here proved to be efficient for fractionating the WPC hydrolysates, especially peptides of molecular masses lower than 1,000 Da. Thus, as shown in Figure 1, the hydrolysates were resolved in four fractions: F1, from 13.0 to 17.0 min (large peptides, with more than 7 amino acids residues); F2, from 17.0 to 20.5 min (medium peptides, with 4 to 7 amino acids residues); F3, from 20.5 to 21.5 min (di- and tripeptides) and F4, from 21.5 to 32.0 min (free amino acids). This result confirms those of previous studies from our group that used the same technique for fractionating enzymatic hydrolysates obtained from whey (Biasutti et al. 2008; Silva et al. 2009; Silva et al. 2010).

Fig. 1. Chromatographic pattern of whey protein concentrate hydrolysates. A, B, C and D: chromatograms of hydrolysates obtained with proteases from *Bacillus licheniformis* (H6), *Aspergillus oryzae* (H12), *Aspergillus sojae* (H18) and pancreatin (H24), respectively. F1: large peptides (> 7 amino acid residues); F2: medium peptides (4 to 7 amino acid residues); F3: di- and tripeptides; F4: free amino acids.

Shown in Figure 1, a significant variation existed between the peptide profiles of WPC hydrolysates obtained using pancreatin and the proteases from *Bacillus licheniformis*, *Aspergillus oryzae* or *Aspergillus sojae*, which could be associated with the differences in enzyme specificities.

Several authors have also reported this variation of the distribution of peptides by chain length due to enzyme. Wroblewska et al. (2004) employed a papain and a protease from *Bacillus licheniformis* in the hydrolysis of WPC (50 ° C, pH 8.0, 120 min). Although no quantitative data were shown, these authors stated that, using HPLC-MS, the best peptide profile was obtained by the action of the protease from *Bacillus licheniformis*, because it produced the least peak area for the non-hydrolyzed protein (> 12,600 Da), and the greatest number of peaks corresponding to peptides with molecular weight less than 1,040 Da.

The peptide profile of WPC hydrolysates, evaluated by high performance capillary electrophoresis, was also different when comparing the action of pancreatin (Sigma, St Louis, MO, USA) and proteases from *Bacillus* sp. (ProtamexTM, Novo Nordisk, Bagsvaerd, Denmark) and *Bacillus licheniformis* (Alcalase 0,6L, Novo Nordisk, Bagsvaerd, Denmark)

(Pacheco and Sgarbieri 2005). Although the authors did not show the molecular mass distributions of the peptides, they stated that the chromatographic pattern of the hydrolysates from the first two enzymes were very similar, considering the similarities of the retention times of the peaks in the electrophoretograms, which were different from those observed for the protease from *Bacillus licheniformis*. According to these authors, these differences could be explained by the different specificities of the enzymes.

Kim et al. (2007) used the reversed phase liquid chromatography with a Zorbax 300SB column to evaluate the peptide profile of WPC hydrolysates obtained by the action of a trypsin, a papain, and two proteases, one from *Bacillus licheniformis* and the other from *Aspergillus oryzae*. The authors inferred that the most extensive hydrolysis was observed with the protease from *Bacillus licheniformis*, considering the greatest number of peaks corresponding to short-chain peptides.

3.3. Peptide and amino acid contents

As shown in Table 2, there was a significant variation in the peptide and free amino acid contents among the different WPC hydrolysates. To choose the most appropriate hydrolysates for the development of nutritional supplements for clinical use, previous studies were considered. According to Frenhani & Burini (1999), during the metabolism of proteins, the first stage of hydrolysis leads to the formation of oligopeptides that contain 2 to 6 amino acid residues and free amino acids. Then, these peptides are broken to di- and tripeptides, and the proteins are finally absorbed in the form of di- and tripeptides and free amino acids. Also, according to these same authors, the di- and tripeptides are absorbed more efficiently than the free amino acids, which, in turn, have greater absorption than the tetra- and higher peptides. For equivalent quantities of di- and tripeptides and mixtures of amino acids, the di- and tripeptides exhibited absorption rates approximately 10 times faster. A study by González-Tello et al. (1994) also reported the advantage of di- and tripeptides over free amino acids with regard to the rate of absorption.

In this context, the criteria for choosing the most advantageous hydrolysates in the present work were associated with the presence of high amounts of di- and tripeptides (fraction F3) and of free amino acids (F4), as well as a low content of large peptides (fraction F1).

Thus, it can be inferred that, from a nutritional standpoint, five hydrolysates (H6, H21, H22, H23 and H24) showed similar peptide profiles. The advantage of H6, with regard to its

higher content of di- and tripeptides, can be compensated by the superiority of the other hydrolysates that had similar (H22) or lower (H23 and H24) large peptides content and/or higher amounts of free amino acids (H21, H22, H23 and H24). Additionally, among the five best hydrolysates, four were prepared with pancreatin (H21, H22, H23 and H24), and only one was prepared with the protease from *Bacillus licheniformis* (H6).

Comparing the results obtained for the large peptides (F1) to the sum of the di- and tripeptides and free amino acids (F3 + F4) in H6 (F1 = 44.61; F3 + F4 = 9.99) and the average of the four hydrolysates above (F1 = 44.13; F3 + F4 = 11.28), a slight superiority, from a nutritional standpoint, was observed when using pancreatin, which yielded a higher value of the sum of di- and tripeptides and free amino acids.

One report was found in the literature on the quantification of peptides from WPC following their fractionation according to their size. Spellman et al. (2005) reported the effect of the action of two enzymatic preparations of *Bacillus licheniformis* (Alcalase 2.4L and Prolyve 1000) and a subtilisin on the peptide profile of WPC hydrolysates, measured by high performance liquid chromatography gel permeation chromatography using a column TKS G2000 SW. These authors concluded that the action of one of the proteases from *Bacillus licheniformis* (Alcalase 2.4L) was the most advantageous because it produced the highest content of peptides with mass less than 1 kDa (81%) when compared with the other protease from *Bacillus licheniformis* (Prolyve 1000) and the subtilisin, that were 62.6% and 63.2% respectively. They also found that the hydrolysate of the protease from *Bacillus licheniformis* (Alcalase 2.4L) contained only 3.2% of peptides having more than 5 kDa, while for the other protease from *Bacillus licheniformis* (Prolyve 1000) and subtilisin these values were 13.8% and 13.1%, respectively. According to these authors, these results could be justified by the fact that the Alcalase 2.4L showed the greatest proteolytic activity (23.0 U mg⁻¹ of enzyme), followed by Prolyve 1000 (18.9 U mg⁻¹ of enzyme) and subtilisin (15.2 mg, 1 U of enzyme).

The peptide profiles of the WPC hydrolysates were previously evaluated in three studies from our group. In the first one, the action of subtilisin (protease from *Bacillus subtilis*, Protemax N200, Prozyn, São Paulo, Brazil) under different conditions led to a better peptide profile than the best results of the present study (H6, H21, H22, H23 and H24), with regard to the higher amounts of di- and tripeptides (13.34%) and free amino acids (45.56%) as well as the smaller large peptide content (12.28%) (Silvestre et al., 2011).

In this study (Silvestre et al., 2011), several WPC hydrolysates were prepared using the same pancreatin as the present study. It was noted that most of the hydrolysates exhibited appropriate peptide profiles from a nutritional standpoint, with low amounts of large peptides

(12.80%, on average) and high amounts of di- and tripeptides (12.11% on average) and free amino acids (49.06% on average) (Silvestre et al., 2011). A comparison with hydrolysate H6 led to the conclusion that these peptide profiles were more nutritionally advantageous. These results were also better than all those obtained from the pancreatic hydrolysates in the current work (H19 to H24), which most likely occurred due to differences in the catalytic activity of the enzyme, which was not reported in the study by Silvestre et al. (2011), and the use of different lots and hydrolytic conditions of WPC.

In the second study, different enzymes and reaction conditions from those used in the current work were used to hydrolyze WPC. The best peptide profile was obtained from the action of a protease from *Aspergillus oryzae* (E:S 1:100, pH 7, 50 °C, 5 h), which was better than that of H6 in terms of the amounts of di- and tripeptides (16.14%) and free amino acids (18.43%), in addition to the lower large peptide content (18.76%) (Silva et al. 2009). This result was also better than those obtained for all of the hydrolysates prepared with the identical enzyme in the current study (H7 to H12). However, a considerable difference was found between the enzymatic activity (512.43 U mL⁻¹) reported by Silva et al. (2009) and the activity in this study (0.69 U mL⁻¹), which could explain the differences of the results.

In the third study, the use of papain (E:S 2:100, pH 7, 55 °C, 5 h) for hydrolyzing WPC produced a better peptide profile than pancreatin (E:S 0.5:100, 1.0:100, 2.0:100 and 3.0:100; pH 7, 50 °C, 5 h), and the peptide profile from papain was also better than the one obtained in the current work for H6 because it showed higher amounts of di- and tripeptides (15.29%) and free amino acids (47.83%) as well as lower amounts of large peptides (25.73%) (Silva et al. 2010). However, the results from Silva et al. (2010) were only reached after having submitted the hydrolysates to ultrafiltration/diafiltration with a 10 kDa cut-off membrane, which probably reduced the amount of non-hydrolyzed substrate and large peptides, increasing proportionally the oligopeptide content.

3.4. Effects of enzyme type and enzyme:substrate ratio on peptide profile

The effect of enzyme type and E:S ratio was evaluated based on two factors. The first involved the production of an appropriate peptide profile from a nutritional point of view, and the second involved a reduction of costs for scaling up the process (e.g., use of a smaller E:S ratio), as we intend to use the best hydrolysates obtained in the current study for the development of nutritional supplements with several clinical applications.

The results from this evaluation are shown in figure form to make their interpretation and discussion easier. Also, instead of showing the values of F3 and F4 separately, the sum of these two fractions was chosen because it represented the form in which proteins are more efficiently absorbed by the body, due to the existence of specific transport systems for these products during protein digestion (Bröer 2008; Gilbert et al. 2008).

3.4.1. Effect of enzyme type

To evaluate the influence of enzyme type on the peptide profiles of WPC hydrolysates, the samples were divided into six groups, each corresponding to a different value of E:S (0.5:100 to 8.0:100), as shown in Figure 2. It was apparent that there was an advantage to using pancreatin over the other enzymes because among the six groups, the lowest amounts of large peptides (F1) and the highest of di- and tripeptides and free amino acid contents (F3 + F4) were obtained from using this enzyme in three (E:S = 2.0:100, 3.0:100 and 4.0:100) and five groups (E:S = 1.0:100, 2.0:100, 3.0:100, 4.0:100 and 8.0:100), respectively. Along the same reasoning, in descending order of the nutritional quality of the peptide profiles were the action of proteases from *Bacillus licheniformis*, *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus sojae*.

Fig. 2. Effect of enzyme type on the peptide profile of whey protein concentrate hydrolysates. Within each group, corresponding to a value of enzyme:substrate ratio, the bars represent the hydrolysates obtained by the action of proteases from (left to right) *Bacillus licheniformis*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus sojae* and pancreatin. F1: large peptides (> 7 amino acid residues); F3 + F4: di- and tripeptides (2 and 3 amino acid residues) + free amino acids. Each value represents the mean of triplicate measurements. Different letters represent significantly different ($p < 0.05$) values for the same E:S ratio of different enzymes.

According to the specificities of the enzymes used in the current work, the results obtained for pancreatin were expected because this is an enzymatic mixture containing both endopeptidases (trypsin and chymotrypsin) and exopeptidases (carboxypeptidases A and B), which lead to the cleavage of protein molecules at specific points, yielding the release of smaller peptides.

However, from a comparison between the action of the protease from *Aspergillus oryzae*, which also constitutes a mixed function enzyme (Rao et al. 1998), with those of the pancreatin and the protease from *Bacillus licheniformis*, it is clear that the former led to a more unfavorable peptide profile. This may at least be partly attributed to its lower enzyme

activity (0.69 U mL^{-1} for the protease from *Aspergillus oryzae* vs. 5.97 U mL^{-1} for pancreatin and 6.22 U mL^{-1} for the protease from *Bacillus licheniformis*).

The peptide profile obtained by the action of the protease from *Bacillus licheniformis* was second best in this evaluation, probably because this is an endopeptidase of broad specificity (Doucet et al. 2003). Also, it had an enzymatic activity slightly higher than pancreatin (6.22 U mL^{-1} for the protease from *Bacillus licheniformis* and 5.97 U mL^{-1} for pancreatin).

The poorest performing enzyme was the protease from *Aspergillus sojae*. It could partly be justified by the fact that this protease is an exopeptidase of the group of leucil-aminopeptidases (EC 3.4.11.1), which are able to release N-terminal amino acids, preferably leucine (NC-IUBMB 2010). Moreover, this enzyme showed the lowest activity (0.63 U mL^{-1}) among all enzymes employed in the current study.

Few reports (Pacheco and Sgarbieri 2005; Silva et al. 2009; Silva et al. 2010) were found in the literature that have addressed the effect of enzyme type on the peptide profiles of WPC hydrolysates. However, two studies have been conducted by our research group, in addition to another study from a separate group. In the first case, seven enzymes were used to hydrolyze WPC, from which three corresponded to those that were employed in the current work (pancreatin and proteases from *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus sojae*), but hydrolysis was performed under different conditions than those used here (Silva et al., 2009). Unlike the results of the current study, the peptide profiles obtained from the protease from *Aspergillus oryzae* were better than pancreatin from a nutritional standpoint, which could be explained by the higher activity reported in this paper for the protease from *Aspergillus oryzae* (512.43 U.mL^{-1} vs. 34.71 U.mL^{-1} for pancreatin). Likewise, in the current work, the protease from *Aspergillus sojae* produced the most unfavorable peptide profile among the three enzymes used and held the last place in this evaluation.

More recently, our group has reported the action of the same pancreatin used in the current study. This enzyme was compared with papain (endopeptidase), and it showed that the former yielded hydrolysates with better peptide profiles in terms of the number of fractions, which were similar to the results reported here. However, the action of papain was considered nutritionally more advantageous because it yielded one of the highest amounts of di- and tripeptides (15.29%) and one of the smallest of large peptides (25.73%) (Silva et al. 2010).

Regarding the results of other authors, Pacheco and Sgarbieri (2005) reported the effect of the actions of three enzymes (a different pancreatin from that used in the current study and two proteases, one from *Bacillus sp.* and the other from *Bacillus licheniformis*) on

the free amino acid content of WPC, evaluated by ion exchange chromatography with derivatization by ninhydrin. As in the present work, the pancreatin was the most beneficial enzyme due to its release of larger amounts of free amino acids, which was followed by the protease from *Bacillus sp.* and then from *Bacillus licheniformis*.

3.4.2. Effect of enzyme:substrate ratio

The effects of the E:S ratio (0.5:100; 1.0:100; 2.0:100; 3.0:100; 4.0:100 and 8.0:100) on the peptide profiles of WPC hydrolysates are shown in Figure 3, where the samples were divided into four groups, each one corresponding to a different enzyme employed in this study.

Fig. 3. Effect of enzyme:substrate ratio on the peptide profile of whey protein concentrate hydrolysates. F1: large peptides (> 7 amino acid residues); F3+F4: di- and tripeptides (2 and 3 amino acid residues) + free amino acids. Each value represents the mean of triplicate measurements. Different letters represent significantly different ($p < 0.05$) values for the same enzyme at different enzyme:substrate ratios.

As also shown in Figure 3, the advantageous use of a lower E:S ratio was observed in some cases for three of the enzymes (*Aspergillus oryzae*, *Aspergillus sojae* and pancreatin), while the same did not occur for the protease from *Bacillus licheniformis*. Concerning the action of *Aspergillus oryzae*, this beneficial effect was noticed when comparing the E:S of 3.0:100 with that of 2.0:100 and observing a reduction in the amounts of large peptides (F1) and an increase of di- and tripeptides as well as free amino acid contents (F3 + F4).

For the protease from *Aspergillus sojae*, a reduction of the amounts of large peptides (F1) was observed with lower E:S ratios in only two situations: from 3.0:100 to 2.0:100 and from 2.0:100 to 1.0:100. For pancreatin, lowering the E:S ratio increased the amounts of F3 + F4 fractions in just one case, when passing from an E:S of 4.0:100 to 3.0:100.

The beneficial effect of using a lower E:S ratio on the peptide profiles of WPC hydrolysates had already been demonstrated in two previous studies from our group. Using the same pancreatin of the current work but in different hydrolytic conditions, it was possible to obtain lower amounts of the large peptide and higher amounts of free amino acids when the E:S ratio decreased from 4.0:100 to 2.0:100 (Silva et al. 2010).

The action of a subtilisin in E:S ratios of 1.0:100, 2.0:100 and 4.0:100 also previously demonstrated, in some cases, the advantageous use of a lower E:S ratio as it was decreased

from 4.0:100 to 2.0:100 and from 2.0:100 to 1.0:100. It led to a reduction of the amount of large peptides and an increase in free amino acid content (Silvestre et al. 2011).

4. Conclusions

The action of pancreatin (E:S of 2.0:100, 3.0:100, 4.0:100 and 8.0:100) and of a protease from *Bacillus licheniformis* (E:S of 8.0:100) proved to be more advantageous than the other enzymes used in the current study, leading to a more appropriate peptide profile for nutritional purposes. Therefore, some of the WPC hydrolysates obtained here could be used to prepare dietary supplements for various clinical applications.

Acknowledgements

The authors thank CNPq, CAPES and FAPEMIG for their financial support.

References

- Barbosa AS, Florentino ER, Florêncio IM, Araújo AS (2010) Utilização do soro como substrato para produção de aguardente: estudo cinético da produção de etanol. *Rev Verde Agroecol Desenvolv Sustent* 5: 7-25.
- Biasutti EAR, Afonso WO, Lopes Junior CO, Coelho JV, Silva VDM, Silvestre MPC (2008) Ação da pancreatina na obtenção de hidrolisados proteicos de soro de leite com elevado teor de oligopeptídeos. *Braz J Pharm Sci* 44: 51-60.
- Brans G, Schroën CGPH, Van der Sman RGM, Boom RM (2004) Membrane fractionation of milk: state of the art and challenges. *J Memb Sci* 243: 263-272.
- Brito MA, Brito JR, Arcuri E, Lange C, Silva M, Souza G. Composição do leite. In: Agência de Informação Embrapa. Available at: www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_128_21720039243.html (accessed 10 Nov 2011).
- Bröer S (2008) Amino acid transport across mammalian intestinal and renal epithelia. *Physiol Rev* 88: 249-286.
- Dias DR, Vilela DM, Silvestre MPC, Schwan RF (2008) Alkaline protease from *Bacillus* sp. Isolated from coffee bean grown on cheese whey. *World J Microbiol Biotechnol* 24: 2027-2034.

- Doucet D, Otter DE, Gauthier SF, Foegeding EA (2003) Enzyme-induced gelation of extensively hydrolyzed whey proteins by Alcalase: peptide identification and determination of enzyme specificity. *J Agric Food Chem* 51: 6300-6308.
- Frenhani PB, Burini RC (1999) Mecanismos de absorção de aminoácidos e oligopeptídeos: controle e implicações na dietoterapia humana. *Arq Gastroenterol* 36: 227-237.
- Gilbert ER, Wong EA, Webb Jr KE (2008) Peptide absorption and utilization: implications for animal nutrition and health. *J Anim Sci* 86: 1493-1501.
- González-Tello P, Camacho F, Jurado E, Páez MP, Guadix EM (1994) Enzymatic hydrolysis of whey proteins. II. Molecular-weight range. *Biotechnol Bioeng* 44: 529-532.
- Horwitz W, Latimer JR, GW (2007) Official methods of analysis of AOAC International. 18th.ed. AOAC International, Gaithersburg.
- Kim SB, Seo IS, Khan MA, Ki KS, Lee WS, Lee HJ, Shin HS, Kim HS (2007) Enzymatic hydrolysis of heated whey: iron-binding ability of peptides and antigenic protein fractions. *J Dairy Sci* 90: 4033-4042.
- Korhonen H, Pihlanto A (2006) Bioactive peptides: production and functionality. *Int Dairy J* 16: 945-960.
- Moreno-Indias I, Castro N, Morales-Delanuez A, Sánchez-Macías D, Assunção P, Capote J, Argüello A (2009) Farm and factory production of goat cheese whey results in distinct chemical composition. *J Dairy Sci* 92: 4792-4796.
- Mortenson MA, Vickers ZM, Reineccius GA (2008) Flavor of whey protein concentrates and isolates. *Int Dairy J* 18: 649-657.
- NC-IUBMB - Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (2010) Enzyme nomenclature: recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the nomenclature and classification of enzymes by the reactions they catalyses. School of Biological and Chemical Sciences, Queen Mary University, Londres. Available at: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme> (accessed: 12 Oct 2011).
- Pacheco MTB, Amaya-Farfan J, Sgarbieri VC (2002) Partial characterization of a whey protein concentrate and its enzyme hydrolysates. *J Food Biochem* 26: 327-338.
- Pacheco MTB, Sgarbieri VC (2005) Effect of different hydrolysates of whey protein on hepatic glutathione content in mice. *J Med Food* 8: 337-342.
- Pimentel-Gomes F (2000) Curso de estatística experimental. 14. ed. Livraria Nobel S/A, Piracicaba. 468p.

- Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Deshpande VV (1998) Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 597-635.
- Sammel LM, Claus JR (2003) Whey protein concentrates effects on pink color development in a cooked ground turkey breast model system. *Meat Sci* 65: 1293-1299.
- Silva MC, Silva VDM, Lana AMQ, Silvestre MPC (2009) Grau de hidrólise e perfil peptídico de hidrolisados enzimáticos do concentrado protéico de soro de leite. *Alim Nutr* 20: 395-402.
- Silva MR, Rodrigues DF, Lana FC, Silva VDM, Morais HA, Silvestre MPC (2010) Perfil peptídico de hidrolisados enzimáticos do concentrado proteico do soro de leite, obtidos pela ação da pancreatina e da papaína. *Nutrire* 35: 97-114.
- Silvestre MPC, Afonso WO, Lopes Junior CO, Silva VDM, Morais HA, Souza MWS, Silva MR. Use of subtilisin and pancreatin for hydrolysing whey protein concentrate. *Am J Food Technol*. 2011; 6: 647-60.
- Silvestre MPC, Hamon M, Yvon M (1994a) Analyses of protein hydrolysates. 1. Use of poly (2-hydroxyethyl-aspartamide)-silica column in size-exclusion chromatography for the fractionation of casein hydrolysates. *J Agric Food Chem* 42: 2778-2782.
- Silvestre MPC, Hamon M, Yvon M (1994b) Analyses of protein hydrolysates. 2. Characterization of casein hydrolysates by a rapid peptide quantification method. *J Agric Food Chem* 42: 2783-2789.
- Sinha R, Radha C, Prakash J, Kaul P (2007) Whey protein hydrolysate: functional properties, nutritional quality and utilization in beverage formulation. *Food Chem* 101: 1484-1491.
- Spellman D, Kenny P, O'Cuinn G, Fitzgerald R (2005) Aggregation properties of whey protein hydrolysates generated with *Bacillus licheniformis* proteinase activities. *J Agric Food Chem* 53: 1258-1265.
- Whetstone AEC, Croissant AE, Drake MA (2005) Characterization of dried whey protein concentrate and isolate flavor. *J Dairy Sci* 88: 3826-3839.
- WHO – World Health Organization (2002) Protein and amino acid requirements in human nutrition. Geneva: WHO, 2002. Available at: www.who.int/nutrition/publications/nutrecomm/en/index.html (accessed: 12 Oct 2011).
- Wróblewska B, Karamać M, Amaraowicz R, Szymkiewicz A, Troszyńska A, Kubicka W (2004) Immunoreactive properties of peptide fractions of cow whey milk proteins after enzymatic hydrolysis. *Int J Food Sci Technol* 39: 839-850.

Table 1 – Chemical composition of whey protein concentrate (WPC)

Ingredients (g%)	Samples of WPC					
	A*	B	C	D	E	F
Protein	34.23 ± 0.23	34.00	34.50	38.60	35.80	32.64
Moisture	5.29 ± 0.12	4.00	3.50	2.40	8.38	5.06
Lipids	0.17 ± 0.01	3.50	3.50	2.80	0.05	0.15
Total ash	4.74 ± 0.11	6.00	6.40	6.50	5.30	7.40
Lactose	54.79 ± 0.68	52.50	52.10	49.80	50.18	54.75

A = WPC used in this study (KERRYLAC 750, Kerry do Brazil Ltda, MG, Brazil); B and C = values reported by Sammel and Claus (2003) for WPC N212BOWPC (Saputo Cheese, Fond du Lac, WI, EUA) and WPC Foremost 356 (Foremost Farms, Baraboo, WI, EUA), respectively; D = values found by Mortenson *et al.* (2008) for WPC from whey mozzarella cheese; E and F = values reported by the same research group of this study (AFONSO *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2009) for WPC KerryLac 750 (Kerry do Brazil Ltda, Três Corações, MG, Brazil) from different lots. * Each value represents the mean of triplicate measurements ± standard deviation.

Table 2 – Peptide and free amino acid contents of chromatographic fractions of whey protein hydrolysates.

Hydrolysates	F1 (> 7 AA residues)	F2 (4-7 AA residues)	F3 (2-3 AA residues)	F4 (free AA)	F3 + F4
H1	71.37 ± 3.78 ^{II}	26.26 ± 3.66 ^{E2}	1.47 ± 0.09 ^{FG3}	0.90 ± 0.08 ^{GHI4}	2.37 ± 0.19 ^{IJK}
H2	68.04 ± 1.87 ^{J1}	29.21 ± 1.71 ^{E2}	1.69 ± 0.17 ^{F3}	1.06 ± 0.13 ^{FGH3}	2.75 ± 0.34 ^{HIJ}
H3	63.97 ± 1.75 ^{K1}	33.18 ± 1.64 ^{D2}	1.70 ± 0.21 ^{F3}	1.15 ± 0.14 ^{FGH3}	2.85 ± 0.21 ^{HI}
H4	67.70 ± 1.43 ^{J1}	29.12 ± 1.56 ^{E2}	1.41 ± 0.09 ^{FG3}	1.77 ± 0.07 ^{F3}	3.18 ± 0.19 ^{GH}
H5	62.56 ± 1.23 ^{K1}	34.18 ± 1.26 ^{D2}	1.44 ± 0.03 ^{FG3}	1.82 ± 0.13 ^{F3}	3.26 ± 0.15 ^{GH}
H6	44.61 ± 1.63 ^{M1}	45.40 ± 1.83 ^{B1}	8.79 ± 0.44 ^{A2}	1.20 ± 0.15 ^{FGH3}	9.99 ± 0.41 ^C
H7	90.86 ± 0.07 ^{E1}	7.45 ± 0.03 ^{HI2}	0.30 ± 0.02 ^{IJ4}	1.38 ± 0.06 ^{FGH3}	1.68 ± 0.05 ^{KLM}
H8	92.10 ± 1.10 ^{DE1}	6.97 ± 1.02 ^{HI2}	0.10 ± 0.01 ^{J4}	0.83 ± 0.10 ^{HIJ3}	0.93 ± 0.14 ^{NO}
H9	82.70 ± 1.21 ^{G1}	11.73 ± 1.46 ^{G2}	1.38 ± 0.16 ^{FG}	4.19 ± 0.39 ^{CD}	5.57 ± 0.41 ^F
H10	86.87 ± 0.33 ^{F1}	9.38 ± 0.27 ^{GH2}	2.39 ± 0.37 ^{E3}	1.35 ± 0.22 ^{FGH4}	3.74 ± 0.32 ^G
H11	75.76 ± 0.79 ^{H1}	15.69 ± 1.01 ^{F2}	4.13 ± 0.53 ^{D3}	4.42 ± 0.14 ^{CD3}	8.55 ± 0.57 ^D
H12	72.73 ± 1.19 ^{I1}	16.74 ± 1.66 ^{F2}	5.66 ± 0.35 ^{C3}	4.87 ± 0.40 ^{C4}	10.5 ± 0.89 ^C
H13	97.89 ± 0.19 ^{AB1}	1.68 ± 0.17 ^{KLM2}	0.25 ± 0.04 ^{J3}	0.18 ± 0.03 ^{IJ3}	0.43 ± 0.08 ^O
H14	95.23 ± 0.25 ^{BC1}	3.60 ± 0.22 ^{JKL2}	1.05 ± 0.07 ^{GH3}	0.12 ± 0.01 ^{J4}	1.17 ± 0.10 ^{MN}
H15	97.35 ± 0.09 ^{AB1}	1.30 ± 0.06 ^{LM2}	0.35 ± 0.00 ^{IJ3}	1.03 ± 0.15 ^{FGH2}	1.38 ± 0.18 ^{MN}
H16	98.21 ± 0.13 ^{A1}	0.26 ± 0.02 ^{M3}	0.50 ± 0.02 ^{IJ3}	1.03 ± 0.10 ^{FGH2}	1.53 ± 0.14 ^{LMN}
H17	94.39 ± 0.29 ^{CD1}	3.51 ± 0.27 ^{JKL2}	0.38 ± 0.03 ^{IJ4}	1.73 ± 0.04 ^{FG3}	2.11 ± 0.08 ^{JKL}
H18	89.73 ± 0.31 ^{E1}	4.62 ± 0.08 ^{IJK2}	0.83 ± 0.06 ^{HI3}	4.81 ± 0.45 ^{C2}	5.64 ± 0.48 ^F
H19	92.38 ± 0.34 ^{DE1}	5.85 ± 0.42 ^{IJ2}	0.34 ± 0.03 ^{IJ4}	1.44 ± 0.21 ^{FGH3}	1.78 ± 0.30 ^{KLM}
H20	66.72 ± 0.34 ^{J1}	27.46 ± 0.85 ^{E2}	2.45 ± 0.16 ^{E4}	3.37 ± 0.51 ^{E3}	5.82 ± 0.75 ^F
H21	49.61 ± 0.40 ^{L1}	42.75 ± 0.65 ^{BC2}	3.67 ± 0.29 ^{D3}	3.97 ± 0.42 ^{DE3}	7.64 ± 0.44 ^E
H22	44.89 ± 1.93 ^{M1}	42.29 ± 1.92 ^{C1}	6.52 ± 0.64 ^{B2}	6.30 ± 0.85 ^{B2}	12.82 ± 0.51 ^B
H23	40.90 ± 0.92 ^{N2}	49.12 ± 0.51 ^{A1}	3.78 ± 0.14 ^{D4}	6.20 ± 0.57 ^{B3}	9.98 ± 0.54 ^C
H24	41.13 ± 2.09 ^{N1}	44.18 ± 2.78 ^{BC1}	6.46 ± 0.12 ^{B3}	8.22 ± 0.88 ^{A2}	14.68 ± 1.23 ^A

Values are in % of nmol of the four fractions and represent the means of triplicate experiments ± standard deviation. Different numbers represent significantly different ($p < 0.05$) values for different fractions of the same hydrolysate. Different letters represent significantly different ($p < 0.05$) values for the same fraction of different hydrolysates. AA = amino acid. F1: large peptides (> 7 amino acid residues); F2: medium peptides (4 to 7 amino acid residues); F3: di- and tripeptides; F4: free amino acids.

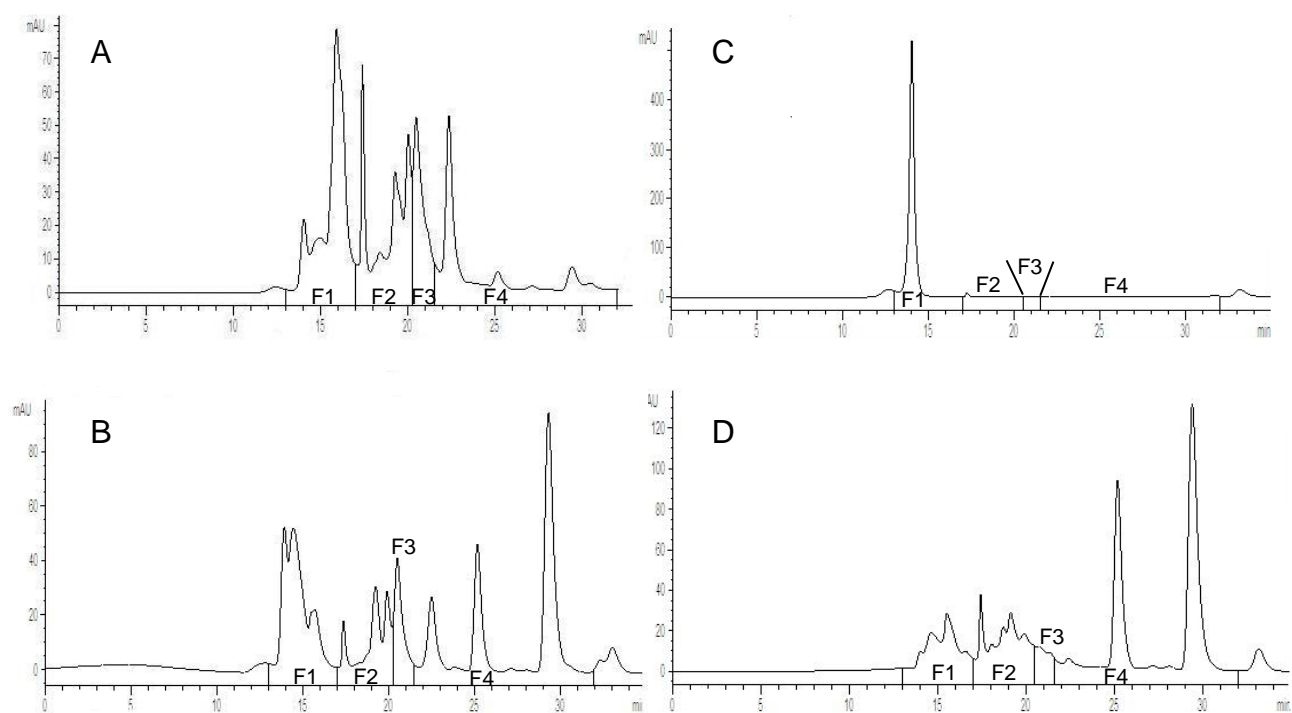


Fig. 1. Chromatographic pattern of whey protein concentrate hydrolysates. A, B, C And D: chromatograms of hydrolysates obtained with proteases from *Bacillus licheniformis* (H6), *Aspergillus oryzae* (H12), *Aspergillus sojae* (H18) and pancreatin (H24), respectively. F1: large peptides (> 7 amino acid residues); F2: medium peptides (4 to 7 amino acid residues); F3: di- and tripeptides; F4: free amino acids.

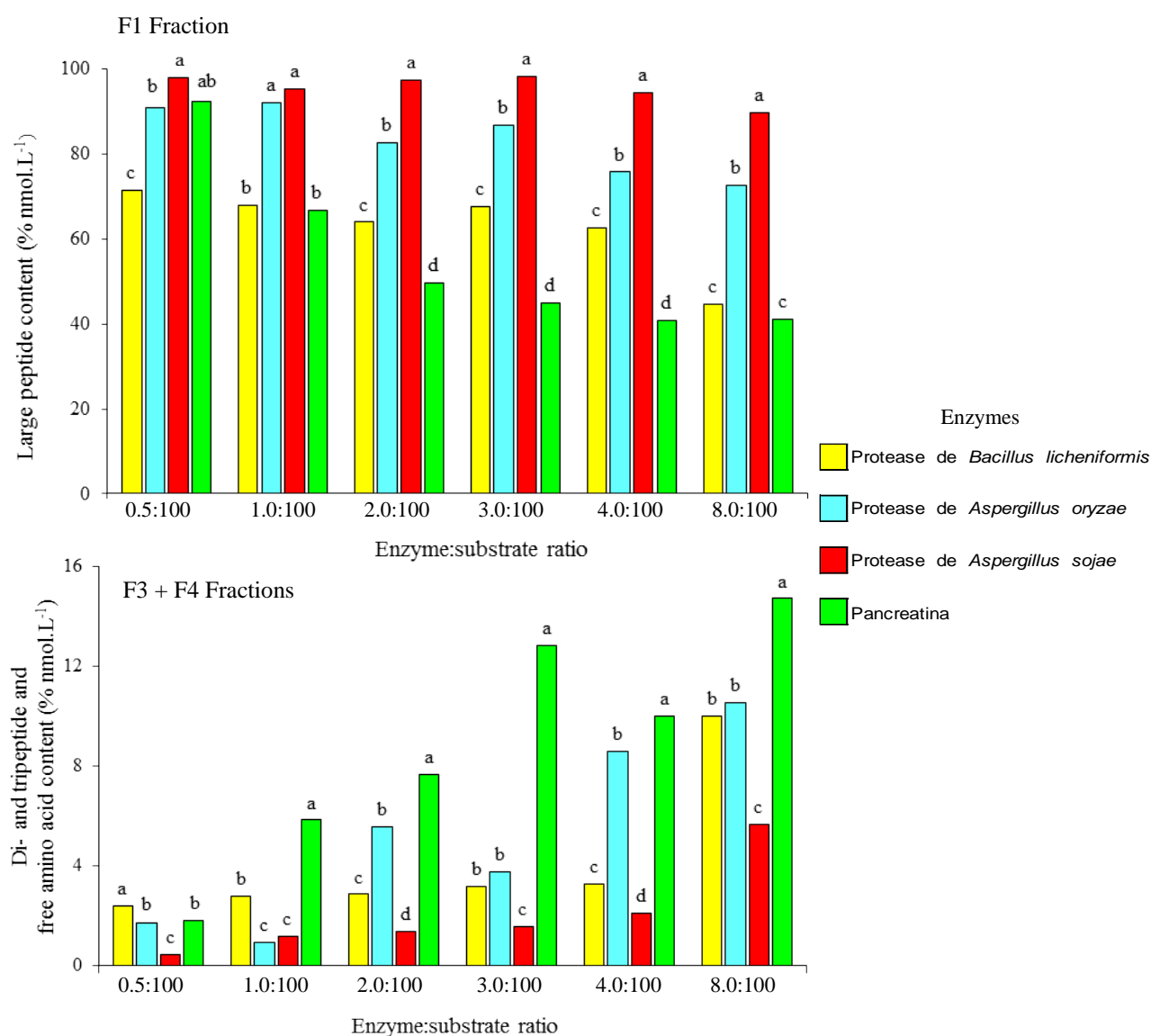


Fig. 2. Effect of enzyme type on the peptide profile of whey protein concentrate hydrolysates. Within each group, corresponding to a value of enzyme:substrate ratio, the bars represent the hydrolysates obtained by the action of proteases from (left to right) *Bacillus licheniformis*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus sojae* and pancreatin. F1: large peptides (> 7 amino acid residues); F3 + F4: di- and tripeptides (2 and 3 amino acid residues) + free amino acids. Each value represents the mean of triplicate measurements. Different letters represent significantly different ($p < 0.05$) values for the same E:S ratio of different enzymes.

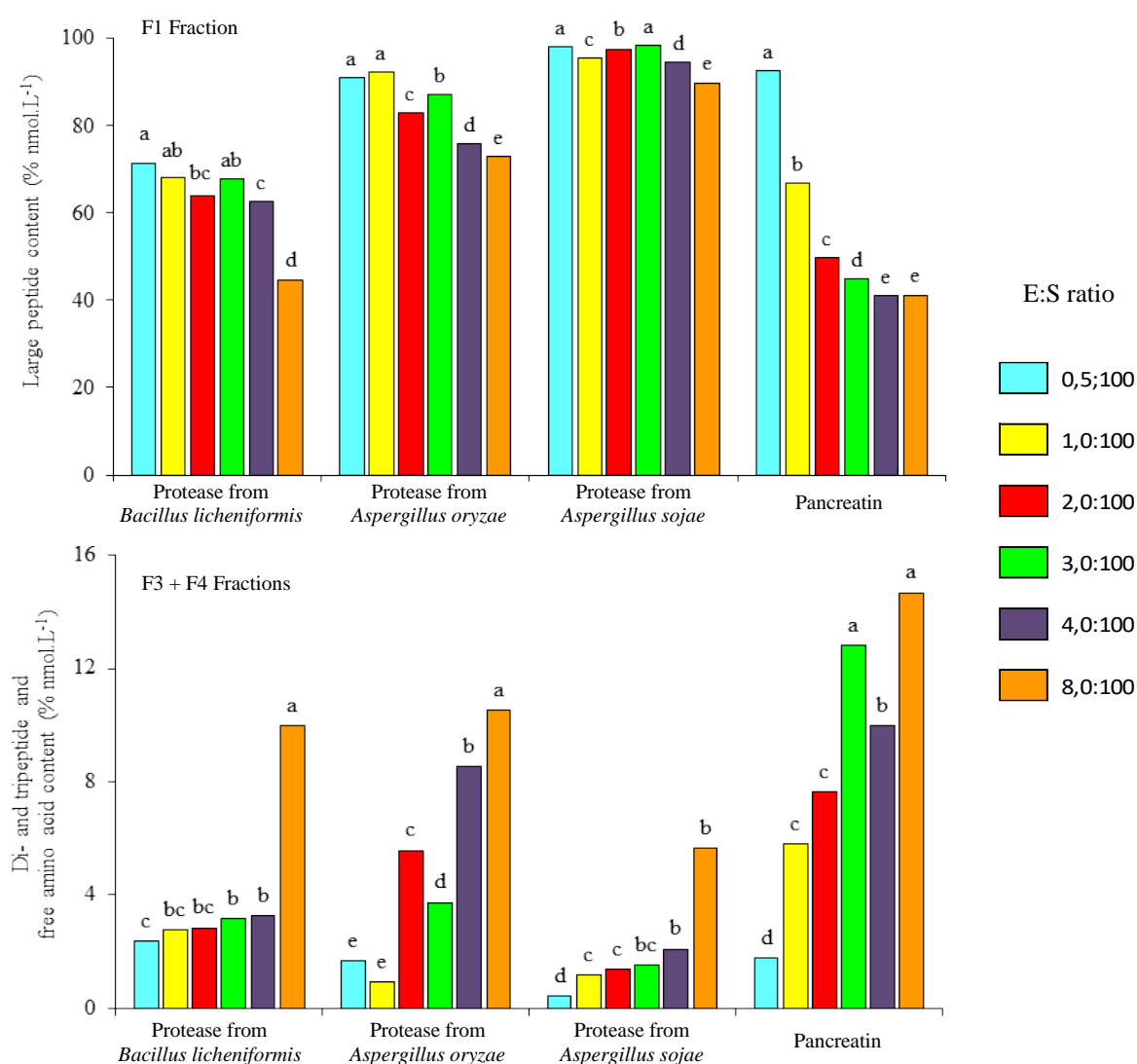


Fig. 3. Effect of enzyme:substrate ratio on the peptide profile of whey protein concentrate hydrolysates. F1: large peptides (> 7 amino acid residues); F3+F4: di- and tripeptides (2 and 3 amino acid residues) + free amino acids. Each value represents the mean of triplicate measurements. Different letters represent significantly different ($p < 0.05$) values for the same enzyme at different enzyme:substrate ratios.

5.2 Correlação entre o grau de hidrólise e perfil peptídico de hidrolisados de concentrado proteico de soro de leite: efeito do tipo de enzima e do tempo de reação

Correlation between the Degree of Hydrolysis and the Peptide Profile of Whey Protein

Concentrate Hydrolysates: Effect of the Enzyme Type and Reaction Time

Degree of Hydrolysis versus Peptide Profile

^{1,2}Harriman A. Morais, ^{2,3}Marialice P.C. Silvestre, ³Viviane D.M. Silva, ³Mauro R. Silva, ²Ana C. Simões e Silva and ²Josianne N. Silveira.

¹Federal University of Jequitinhonha and Mucuri Valleys (UFVJM), Diamantina, MG, Brazil. ²Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brazil. ³EDETEC Food Industry S.A., Belo Horizonte, MG, Brazil.

Corresponding author: Marialice P.C. Silvestre, EDETEC Indústria Alimentícia S/A, Av. José Cândido da Silveira, 2100, 31035-536, Belo Horizonte, MG, Brazil, Tel: +55 31 3486-4167. E-mail: malice@ufmg.br

ABSTRACT

The use of protein hydrolysates for the development of new food products requires their prior characterization including the determination of the degree of hydrolysis (DH) and the distribution of peptides according to the chain length. In this study, the DH of whey protein concentrate hydrolysates was determined by four methods (formol titration, soluble protein content, orthophthalaldehyde and osmometry) and the peptide profile was characterized by size-exclusion high performance liquid chromatography. The correlations among the four methods as well as between the DH and peptide profiles were established. The highest DH values were obtained by the methods of the soluble protein content (44.7%) and the derivatization with orthophthalaldehyde (20.17%) for the proteases from *Bacillus licheniformis* and *Aspergillus sojae*, respectively. The use of the *Bacillus licheniformis* protease was more advantageous because it produced the highest contents of di- and tripeptides (8.79%) and the lowest of large peptides (53.57%). A significant correlation ($p < 0.05$) between the DH and the contents of peptides and free amino acids was observed, and the intensity of the correlation varied as a function of the method and the enzyme type analyzed.

Key words: whey protein concentrate hydrolysates, degree of hydrolysis, peptide profile, protease from *B. licheniformis*, protease from *A. sojae*.

INTRODUCTION

Whey is a by product of the dairy industry that has little commercial value, and its disposal remains one of the most serious problems in the dairy industry of several countries (Carrasco and Guerra, 2010). Therefore, it is important to create new options for the use of whey, which contains several constituents, especially proteins and peptides, that can be of great value for the biotechnology, medical and agroindustrial areas (Smithers, 2008). One method to increase the use of whey is the enzymatic hydrolysis, and this process may contribute to the improvement of the nutritional, functional, immunological and biological activity of whey proteins (Pacheco and Sgarbieri, 2005; Cheison et al., 2009).

However, the use of protein hydrolysates for the development of new food products or dietary supplements requires the prior characterization of the hydrolysates, including the determination of the degree of hydrolysis (DH) and the distribution of peptides according to the chain length (Silvestre, 1997; Guadix et al., 2000; Leonil et al., 2000).

According to Cheison et al. (2009), the DH is an important parameter to understand and interpret the effects and extent of the hydrolytic process of proteins and is useful to establish the relationships between proteolysis and the improvement of the functional, bioactive and sensory properties of these biomolecules.

Several methods for estimating the degree of protein hydrolysis are available, and different approaches are required to determine the DH of different products. These methods are based on four different principles. First of all, the determination of the hydrolytic release of nitrogen, which becomes soluble in the presence of a precipitating agent, such as trichloroacetic acid. In the second position comes the determination of free α -amino-groups. The third principle is the titration of protons released after the rupture of peptide bonds.

Finally, we can find the measurement of the changes in the freezing point of the protein solution by osmometry (Silvestre, 1997, Nielsen et al., 2001; Spellman et al., 2003).

In the current study, four techniques based on different principles were used for the assessment of DH: 1) the formol titration, based on an acid-base titration, 2) the determination of soluble protein content in the presence of a precipitating agent, 3) the reaction of α -amino groups, that were released during hydrolysis, with ortophthalaldehyde; 4) the detection of the freezing point of solutions by osmometry.

The choice of these methods was based on the fact that although there is a broad scientific publication on the determination of DH of whey proteins, few data are found in the literature about the comparison of methods used for assessing this parameter for whey proteins, especially concerning the use of techniques based on different principles. Moreover, in these studies the comparison was carried out only between methods based on the reaction of α -amino groups with either derivatizing agents (ortophthalaldehyde and/or 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid) (Nielsen et al., 2001) or pH stat method that determines the quantity of alkaline solution (measured by automatic titration) needed to keep the pH constant throughout the reaction (Spellman et al., 2003; Cheison et al., 2009). This fact justifies the performance of the current study which main goal is to establish the DH method that best correlates with the peptide profile. Therefore, this method could be used as a rapid screening of the most appropriate protein hydrolysate to be used in the development of high-nutritional value food products.

Additionally, the current work represents the first time that some methods were used for assessing the degree of hydrolysis of whey protein concentrate (WPC) hydrolysates obtained by the action of *Bacillus licheniformis* and *Aspergillus sojae* proteases. This is the case of the methods of the soluble protein content and osmometry for both enzymes and also the ortophthalaldehyde (OPA) method for the second enzyme.

To our knowledge, the current work represents the first time it was established a correlation among the four methods used in the present work to determine the degree of hydrolysis of WPC hydrolysates obtained by the action of *Bacillus licheniformis* and *Aspergillus sojae* proteases.

Aiming at using a protein hydrolysate for dietetic purpose, a characterization regarding the size distribution of peptides is needed, because the length of the peptide chain influences the rate of absorption. Regarding this subject, several chromatographic techniques have been described in the literature, but they have shown some drawbacks, such as interactions between the solute and the stationary phase and inefficiency in separating small peptides (Silvestre et al., 2011). For these reasons, our group (Silvestre et al., 1994a, 1994b) has developed a method based on the fractionation of peptides by size exclusion high performance liquid chromatography which allowed to separate and quantify peptides with molecular masses smaller than 1,000 Da, and this technique was employed in the current work.

It is worth stating that as far as we know the correlation between the DH and peptide profile of WPC hydrolysates has never been established before.

This study was conducted to examine the following: a) the preparation of WPC enzymatic hydrolysates using the proteases from *B. licheniformis* and *A. sojae*; b) the characterization of these hydrolysates in relation to the DH and peptide profile; c) the evaluation of the effects of enzyme type and the reaction time on the DH; d) the comparison of four methods for quantifying the DH; and e) the study of the correlation between the DH and the peptide and free amino acid content.

MATERIAL AND METHODS

Materials

WPC (Kerrylac 750) in powdered form was kindly furnished by Kerry of Brazil Ltda. (Três Corações, MG, Brazil). Proteases from *Bacillus licheniformis* (Alcalase®, activity = 6.22 U mL⁻¹) and *Aspergillus sojae* (Corolase LAP®, activity 0.63 U mL⁻¹) were kindly furnished by AB Enzymes (Barueri, SP, Brazil). In this study, the enzyme activity was defined as the amount of enzyme that liberated 1 g of tyrosine in 1 min at 37 °C.

The Folin-Ciocalteu reagent (code F9252), bovine serum albumin (code A2153), orthophthaldehyde (OPA, Code P0657) and 2-mercaptoethanol (code M6250) were purchased from Sigma (São Paulo, SP, Brazil). The formic acid was purchased from Merck (Whitehouse Station, NJ, USA). The polyvinylidene fluoride membranes used for the filtration of the samples (0.22 µm) and solvents (0.45 µm) as well as the tangential flow system with a 10 kDa cut-off membrane were purchased from Millipore (São Paulo, SP, Brazil). All other reagents used in this study were of analytical grade.

The HPLC system used for fractionating protein hydrolysates consisted of one isocratic pump and a UV-Vis detector (1200 Series, Agilent, Santa Clara, CA, USA) coupled to a computer with ChemStation software for LC Systems (Agilent, Santa Clara, CA, USA). A poly (2-hydroxyethylaspartamide)-silica (PHEA) column (250 x 9.4 mm, 5 µm and 200 Å pore size) was used for HPLC. The water for HPLC was purified by passage through a MilliQ water purification system (Millipore, Billerica, MA, USA).

Preparation of hydrolysates from whey protein concentrates

Ten hydrolysates from WPC were prepared by varying the enzyme type and the reaction time. The conditions of hydrolysis are listed in Table 1. The pH and temperature values corresponded to the optimal conditions for the enzymes and were provided by the manufacturer.

The 10% (w/v) WPC solutions, which corresponded to 3.42% protein (w/v), were prepared in distilled water, and the pH was adjusted to 8.0 with a 3 mol L⁻¹ NaOH solution. Subsequently, the WPC solutions were heated in an oil bath with continuous stirring (stirrer 752A model from Fisatom, São Paulo, SP, Brazil), and the enzymes were added in an appropriate quantity to attain an enzyme: substrate ratio of 8.0:100. The reaction time varied from 1 h to 5 h, and the hydrolytic reaction was stopped by heating the samples at 75 °C for 15 sec. The hydrolysates were immediately used for the determination of DH and then freeze-dried (Freeze Dry System/FreeZone 4.5, model 77500, Labconco, Kansas City, MO, USA) for the characterization of peptide profile. The hydrolysates were stored in the freezer (-20 °C) until analysis.

Determination of the degree of hydrolysis

In this study, the degree of hydrolysis was evaluated using four different methods. Two methods were based on the determination of α -amino nitrogen (formol titration and derivatisation with OPA), and the other methods relied on the depression of the freezing point (osmometry) and on the quantification of the soluble protein content after precipitation with trichloroacetic acid. For all methods, a blank using unhydrolyzed WPC was submitted to the same procedure of the hydrolyzed samples.

Formol titration

The DH was calculated using the relationship between α -amino nitrogen (AN) and total nitrogen (TN) according to equation 1:

$$\% \text{ DH} = \frac{\alpha\text{-amino nitrogen (AN)}}{\text{total nitrogen (TN)}} \times 100 \quad (1)$$

The Sorensen method (AOAC, 1995) based on titration with formaldehyde was used for quantifying the AN. The formaldehyde 1 reagent was prepared by diluting 25 mL of the commercial solution with 50% ethanol to a final volume of 250 mL. The pH was adjusted to 7.0 with 0.2 mol L⁻¹ NaOH solution just before use. The pH of the hydrolysate solution was also adjusted to 7.0 with 0.2 mol L⁻¹ NaOH solution. Three milliliters of the formaldehyde reagent were added to 3 mL of the hydrolysate solution, and the mixture was stirred and then titrated with 0.2 mol L⁻¹ NaOH solution with phenolphthalein as an indicator to its final end point. An excess of 0.2 mol L⁻¹ NaOH solution was added, and the solution was then back-titrated with 0.2 mol L⁻¹ HCl solution until colourless. The volumes of NaOH and HCl solutions required were recorded. The TN was determined by the Kjeldahl method (AOAC, 1995).

Derivatization with orthophytaldehyde

For this analysis, the OPA reagent was prepared according to Church et al. (1983). A volume of 25 mL of sodium tetraborate solution (100 mmol L⁻¹) was mixed with 2.5 mL of 20% (w/v) sodium dodecyl sulphate solution, 40 mg of OPA (dissolved in 1 ml of methanol)

and 100 μL of 2-mercaptoethanol. The volume was adjusted to 50 mL using type I water. The reagent was always prepared immediately before use and placed in a vial covered with aluminium foil to protect it from light.

The method described by Spellman et al., 2003) was used with some modifications for the derivatization. A volume of 10 μL of the sample was mixed with 3.4 mL of the OPA reagent, and this mixture was allowed to stand at 25 $^{\circ}\text{C}$ for 2 min. Subsequently, the absorbance was read at 340 nm. The degree of hydrolysis was calculated according to equation 2:

$$\text{DH (\%)} = \frac{(\text{ABS} \times 1,934 \times d)}{c} \quad (2)$$

where ABS is the absorbance of the samples, d is the dilution factor and c the protein concentration of the sample (g L^{-1}).

Osmometry

For this analysis, a sample volume of 50 μL was immediately removed after the reaction to determine the freezing point, which was measured using a micro-osmometer (Precision System 5004, Spectrun, São Paulo, Brazil). The depression of freezing point was used to determine the degree of hydrolysis, according to equation 3, proposed by Adler-Nissen (1986):

$$\text{GH (\%)} = \left(\frac{\Delta C}{\text{P\%} \times f_{\text{osm}}} \right) \times \left(\frac{1}{\omega} \right) \times \left(\frac{1}{h_{\text{tot}}} \right) \times 100 \quad (3)$$

where ΔC is the osmolarity (mOsmol L^{-1}), $P\%$ is the protein concentration (g of protein/kg of water), $1/\omega$ is the calibration factor of the osmometer, which represents the reciprocal of the osmotic coefficient of peptides that is supposed to be a constant value of 1.04, and h_{tot} is the total number of peptide bonds in the protein, which is 8.8 mEq g^{-1} of protein for whey.

Soluble protein content in trichloroacetic acid

The degree of hydrolysis of WPC was also determined by the percentage of soluble protein in 10 g% (w/v) trichloroacetic acid (TCA) in relation to the total protein content of the sample according to Hoyle and Merritt (1994), with modifications. Hydrolysate aliquots of 500 μL were mixed with 500 μL of 20 g% of TCA solution to obtain the soluble and insoluble fractions in 10 g% TCA. After 30 min of rest, the mixture was centrifuged at $3000 \times g$, and the soluble protein content of the supernatant was determined by the method of Lowry et al. (1951), modified by Hartree (1972), and the result was expressed as mg of protein. Bovine serum albumin was used as the standard. The degree of hydrolysis was calculated according to equation 4:

$$\text{DH (\%)} = \frac{\text{soluble protein content in 10 g\% TCA (mg)} \times 100}{\text{total protein content (mg)}} \quad (4)$$

Characterization of peptide profiles from WPC hydrolysates

The characterization of peptide profiles was performed in two stages, which included the fractionation of peptides by size and their subsequent quantification. The fractionation of WPC hydrolysates was performed by size exclusion (SE) HPLC on a PHEA column, according to the method previously developed by our group ((Silvestre et al., 1994a), using

0.05 mol L⁻¹ formic acid (pH 2.5) as the mobile phase and isocratic conditions at a flow rate of 0.5 mL min⁻¹ for 35 min. The samples were dissolved in the mobile phase (0.1% w/v) and filtered through a membrane of 0.22 µm, and 50 µL of these solutions were injected onto the column. The mobile phase was filtered through a membrane of 0.45 µm and degassed by sonication in an ultrasound bath (USC1400 model, Unique, Santo Amaro, SP, Brazil) for 30 min before use.

The rapid method of Correct Fraction Area (CFA) that was previously developed by our group (Silvestre et al., 1994b) was used to quantify the peptides and free amino acids in the SE-HPLC fractions of the WPC hydrolysates. Briefly, five whey standard hydrolysates (two using trypsin and three using pancreatin) were prepared and then fractionated into four fractions by SE-HPLC, as described above. The four fractions were collected (Fraction Collector, CF-1 model, Spectrum Chrom, Houston, TX, USA) and submitted to amino acid analysis following solvent removal (Centrivap, 78100-00D model, Labconco, Kansas City, MO, USA). The calculation of CFA was performed using specific formulas after detection at three wavelengths (230, 280 and 300 nm) to remove the contribution of aromatic amino acids. A standard curve was drawn to correlate CFA with the amino acid contents of the fractions.

Statistical analysis

All determinations were performed in three replicates, each measured by triplicate analysis. To verify significant hydrolysis effects among the different treatments, a completely randomized design was adopted in analysis scheme split-plot (4 x 6 methods hydrolysis times), and the results were analyzed with software SISVAR version 5.3 (Ferreira, 2010). An experimental design was adopted of completely randomization for factorial analysis (2 x 6 enzyme hydrolysis times) of the peptide profiles, and the results were analyzed with Statistica

software (Stat Soft 2000). The ANOVA and Duncan test at 5% probability were used to determine differences between the means of the degree of hydrolysis as well as the contents of peptides and free amino acids in the WPC hydrolysates. Significant differences ($p < 0.05$) between the means were evaluated by Duncan's test (Pimentel-Gomes 2000). The correlations between the degree of hydrolysis obtained by different methods with the contents of the peptides and free amino acids were obtained by Pearson's correlation coefficient (r), which measures the degree of association between two variables, and p was calculated with t-tests, using the software BioStat (Ayres et al, 2007) for data analysis.

RESULTS AND DISCUSSION

In general, the DH evaluation methods that gave the highest results were the soluble protein content and OPA for the hydrolysates prepared with proteases from *B. licheniformis* and *A. sojae*, respectively. A positive and significant correlation of strong intensity was observed in three cases for the *B. licheniformis* protease and in only one case for the *A. sojae* protease. Regarding the peptide profile, three hydrolysates obtained by the action of *B. licheniformis* protease were considered the best from a nutritional standpoint. The correlation between DH and the chromatographic fractions of the WPC hydrolysates ranged with either the method of determination or the enzyme. The results will be discussed in more detail below.

Influence of the methods on the degree of hydrolysis

Figure 1 demonstrates the wide range of DH values obtained by the action of the *B. licheniformis* protease using different methods. The results of the DH values of the

samples were deducted from the DH values of the blank (26.6% for OPA, 8.4% for soluble protein content, 6.7% for formol titration and 7.4% for osmometry). The highest value (44.7%) was obtained for the hydrolysate H5 using the soluble protein content method. In fact, for all hydrolysates (H1 to H5), the highest values were obtained by this method and were much higher than those obtained by the other three methods (OPA, osmometry and formol titration).

In the soluble protein content method, the addition of trichloroacetic acid results in partial or total precipitation of non-hydrolyzed proteins and high molecular mass peptides (Carreira et al., 2003), producing a higher concentration of soluble free amino acids and small peptides that are found in the supernatant. Considering that the protease from *B. licheniformis* is an endopeptidase of broad specificity (Doucet et al., 2003) and also shows high enzymatic activity (6.22 U mL⁻¹), its action may have led to more extensive WPC hydrolysis, thereby resulting in high levels of small peptides. These peptides may have remained soluble after the addition of trichloroacetic acid, contributing to the higher degree of hydrolysis obtained with this method.

After the soluble protein content method, the method that produced the highest values of the DH with the *B. licheniformis* protease was the OPA method, as indicated in Figure 1. Only for the hydrolysate H5 no significant difference was observed between the results obtained by the OPA and formaldehyde methods. It is worth stating when using the OPA method that the whey proteins have a high percentage of lysine, which ϵ -amino group can also react with the derivatizing agent leading to an overestimation of the DH (Church et al. (1983). This could explain, at least in part, the second position occupied by the OPA method in terms of higher values of DH. However, according to Church et al. (1983), this reaction with the ϵ -amino groups would not interfere with the detection of α -amino groups, which are exposed during the hydrolysis of WPC proteins.

Other authors have also used the OPA method for evaluating the DH of WPC proteins. Spellman et al., 2003) studied the action of a *B. licheniformis* protease in the hydrolysis of WPC 75 using reaction conditions (pH 7, 50 °C, 6 h) differing from the current work and reported a maximum DH of 13.3%. This is lower than the values obtained in this study, which ranged from 18.4 to 21.1%, although the same method was used to determine the DH. According to Spellman et al., 2003), the low DH values found in their work may be explained by the fact that whey proteins are rich in cysteine, which reacts weakly and unstably with OPA. Alternatively, the higher results obtained here could be explained by the addition of 2-mercaptoethanol and the preparation of the hydrolysates at pH 8.0. In fact, according to Roth (1971), the reaction of cysteine with OPA can be optimized in the presence of a strong reducing agent, and an alkaline medium contributes to increased of the stability of the compound formed.

The formaldehyde method produced the third highest DH values, as demonstrated in Figure 1 for the *B. licheniformis* protease. Significant differences were observed between the results obtained by the formaldehyde method and by osmometry, with the exception of the H1 hydrolysate. The ranking of the formaldehyde method among all of the methods used could be explained, at least in part, by the fact that the action of *B. licheniformis* protease increased the release of hydrophobic or aromatic residues (Gupta et al., 2002, Rawlings et al., 2010), which may have interfered with the titration of protons released by the addition of formaldehyde (Levy, 1935) and resulted in an underestimation of DH values. Although this interference is inconvenient, several authors claim that the technique of formaldehyde, if properly standardized, represents an efficient, fast and cost-effective method for monitoring the hydrolytic process of proteins and has already been used in different protein sources (Denis et al., 2008; Cao et al., 2009; Zheng et al., 2009; Zhao and Hou, 2009).

To the authors' knowledge, with respect to the DH of WPC, titration with formaldehyde was only used in another work by our group. Silva et al. (2009), using the proteases from *B. subtilis* and *B. amyloquefaciens* to hydrolyse WPC under different conditions than those used here (pH 9, 55 °C and pH 7, 55 °C), obtained DH values of 20% and 14%, respectively, which are lower than the maximum value obtained in the current study (21.2%) with the formaldehyde method. These differences in DH values obtained by the same research group can be explained by the variety of parameters used in the preparation of the hydrolysates (pH, temperature and enzyme: substrate ratio), as well as the use of different lots of WPC and enzyme.

Among all of the methods used in the current work, osmometry exhibited the lowest DH results (from 3.3 to 4.1%) when using the *B. licheniformis* protease (Figure 1). A probable explanation for these low values could be related to the fact that the *B. licheniformis* protease is an endopeptidase (Gupta et al., 2002, Rawlings et al., 2010) and therefore releases more peptides than free amino acids, thus reducing the DH determined by the osmometry. It is well known that osmometry produces higher values when the number of soluble molecules in the sample is greater, which decreases the freezing point of the solution (Wong and Boyce, 1988). Also, according to some authors (Ju et al., 1995; Otte et al., 1996; Doucet et al., 2001), the increase in the number of peptides in a solution can produce aggregation between the peptides, which would result in a gradual increase in the viscosity and turbidity of the samples, interfering with the determination of DH by osmometry.

No report was found in the literature on the use of the methods of the soluble protein content and osmometry for assessing the degree of hydrolysis of WPC by the action of a *B. licheniformis* protease.

Figure 2 demonstrates the wide range of DH values observed for the action of *A. sojae* protease, as shown for the *B. licheniformis* protease, which varied by the method used. Also,

the results of the DH values of the samples were deducted from the DH values of the blank (25.5% for OPA, 8.6% for soluble protein content, 4.6% for formol titration and 7.9% for osmometry). The highest value (20.2%) was obtained for the hydrolysate H10 using the OPA method.

For all hydrolysates (H6 to H10), a significant variation was observed in the DH values obtained by the OPA method, and these values were much greater than those obtained by the other three methods. Considering that the *A. sojae* protease is an exopeptidase capable of releasing N-terminal amino acids (NC-IUBMB, 2010), the results obtained by the OPA method were expected; the greater the release of free amino acids, the higher is the number of free α -amino groups available to react with OPA and therefore the greater the DH obtained with this method.

After the OPA method, the method that produced the higher values of DH with the *A. sojae* protease was the formaldehyde method, as shown in Figure 2. The results obtained by the formaldehyde and osmometry methods differed significantly, with the exception of the H6 hydrolysate. The release of α -amino groups by the action of the *A. sojae* protease could explain the lower DH values obtained by the formaldehyde method when compared to the OPA method; according to Spellman et al., (2003), these α -amino groups have pK values considerably higher as free amino acids than within polypeptides. Additionally, as described above for the *B. licheniformis* protease, some interference may have occurred with the titration of the protons released by the addition of formaldehyde, resulting in an underestimation of the DH values obtained with the formaldehyde method.

As far as the authors are aware with respect to the DH of WPC, formol titration was only used in another work by our group. Silva et al. (2009) used an *A. sojae* protease for the hydrolysis of WPC, similar to the current study, under different hydrolytic conditions than those used here (pH 9, 55 °C) and obtained a DH of 2.5%, which is lower than almost all of

the values obtained using the same method in this study, i.e., from 2.79% to 12.98% for hydrolysates H7 to H10, respectively. As cited above, these differences in the values of DH obtained by the same research group can be explained by the variety of parameters used in the preparation of the hydrolysates (pH, temperature and enzyme: substrate ratio) as well as the use of different lots of WPC and enzyme.

The soluble protein content method ranked just after formaldehyde in terms of DH values for the *A. sojae* protease, as demonstrated in Figure 2. Considering that the use of trichloroacetic acid causes the precipitation of the intact protein and high molecular weight peptides (Carreira et al., 2003), the values obtained by the soluble protein method could be explained, at least in part, by the specificity of the *A. sojae* protease, an exopeptidase only capable of releasing N-terminal amino acids. Further, the low activity (0.63 U mL^{-1}) of this enzyme could have contributed to a smaller rupture of the protein molecules, leading to a decreased amino acid content in the supernatant and therefore a smaller DH than the *B. licheniformis* protease.

As shown for the *B. licheniformis* protease, the lowest DH values were observed when the osmometry was used to evaluate the DH by the *A. sojae* protease (Figure 2). According to Dzwolak and Ziajka (1999), the osmotic coefficient (ω) of a sample varies with the concentration and type of solute and is higher for amino acids than peptides and intact proteins. Because *A. sojae* protease is an exopeptidase, the release of amino acids by the action of this enzyme can increase the osmotic coefficient of the sample, changing the viscosity and consequently reducing the DH measured by osmometry.

No report was found in the literature on the use of the methods of OPA, soluble protein content and osmometry for assessing the degree of hydrolysis of WPC by the action of an *A. sojae* protease.

Influence of the reaction time on the degree of hydrolysis

Figure 1 demonstrates that the reaction time with the *B. licheniformis* protease influenced the DH obtained by the soluble protein content method, especially when it increased from 2 h to 3 h and from 4 h to 5 h, where there was a concomitant increase from 41.6% to 43.7% and from 43.5% to 44.7%, respectively. When using the OPA method, an increase in the DH was observed when increasing from 1 h to 3 h (from 18.4% to 20.7%, respectively) and subsequently remained unchanged after this time. For the formaldehyde method, there was also a marked increase in the DH (from 3.4% to 15.7%) when the reaction time increased from 1 h to 2 h, with a slight further increase observed until the maximum value of 21.2 % was obtained at 5 h. For the osmometry method, only a slight increase in the DH was detected when the reaction time changed from 2 h (3.4%) to 3 h (4.1%).

These results indicate that the formaldehyde method is the most suitable among those that have been tested here for evaluating the DH of WPC hydrolysates obtained by the action of the *B. licheniformis* protease because this method exhibited more pronounced differences in the DH values with the reaction time.

No literature report was found in evaluating the hydrolysis WPC by the *B. licheniformis* protease under the same hydrolytic conditions as the current study. However, in contrast to the result found in the current study, Spellman et al., 2003), using a *B. licheniformis* protease in the hydrolysis of a sample of WPC 75 (73.96% protein) under different hydrolytic conditions than those used here (E:S 0.25:100; pH 7.0; 50 °C; 6 h), reported a change in the DH during the first hour of reaction when using the OPA method. These differences between these two studies could be explained by the use of different WPC and hydrolytic conditions.

In the case of the *A. sojae* protease, the effect of reaction time on the degree of WPC hydrolysis can be observed in Figure 2. Initially, one can observe that the reaction time influenced the DH for all methods. When using the OPA method, there was an increase in the DH from 2 h (11.53%) to the maximum at 5 h (20.17%). With the formaldehyde method, the DH increased from 1 h (1.11%) to 3 h (6.20%), remained constant between 3 h and 4 h (6.92%) and increased sharply at 5 h (12.98%). For the soluble protein content method, there was an increase in the DH between 1 h (0.41%) and 2 h (3.43%) followed by a decrease between 2 h and 3 h (2.40%). No change in the DH occurred between 3 h (2.40%) and 4 h (2.40%), and the DH increased again to reach 3.94% at 5 h, a value similar to that obtained at 2 h. For the osmometry method, the DH varied over the course of the hydrolytic reaction between 2 h (0.98%) and 3 h (1.70%) and between 3 h and 4 h (1.18%).

These results indicate that the OPA and formaldehyde methods are the most suitable of those tested here for evaluating the DH of WPC hydrolysates obtained by the action of the *A. sojae* protease because they exhibited more pronounced changes in the DH values with reaction time.

No report was found in the literature evaluating the hydrolysis extent of WPC by the *A. sojae* protease under the same hydrolytic conditions as the current study. However, Spellman et al., 2003) used an *Aspergillus niger* protease (Debitrase HYW20), which is also an exopeptidase, in the hydrolysis of WPC 75 (73.96% protein) under different hydrolytic conditions than those used here (E:S of 1:100, pH 7.0, 50 °C, 1-6 h). These authors reported a variation in the DH, measured by the OPA method, during the first hour of reaction, a result that differs from that observed in the present work. This is likely related to differences in the WPC samples as well as in the proteolytic activities of the enzymes, which were not mentioned in the work of Spellman et al., 2003).

Correlation among the methods for determining the degree of hydrolysis

The results of this analysis for each of the two proteases are shown in Table 2. A positive and significant correlation of strong intensity was observed in three cases for the *B. licheniformis* protease (formaldehyde with soluble protein content, OPA with osmometry and osmometry with soluble protein content) and in only one case (formaldehyde with OPA) for the *A. sojae* protease because, according to Sampaio's statement (Sampaio, 2002), the values for these correlations are above 0.7, with $p < 0.05$.

For the *B. licheniformis* protease, no report was found in the literature on the correlation among the methods used here for evaluating the DH of WPC. However, Spellman et al., 2003) observed a correlation between the DH values WPC obtained by the TNBS and pH stat methods using this same enzyme under different hydrolytic conditions. However, no mention was made by these authors about the data for their statistical analysis. For the *A. sojae* protease, no data were found in the literature concerning the correlation among methods for assessing the DH of WPC.

Peptide profile of WPC hydrolysates

The technique used here efficiently fractionated the protein hydrolysates, especially peptides of molecular mass lower than 1.000 Da. As illustrated in Figure 1, the hydrolysates were resolved in four fractions: F1, from 13.0 to 17.0 min (large peptides with more than 7 amino acid residues); F2, from 17.0 to 20.5 min (medium peptides with 4 to 7 amino acid residues); F3, from 20.5 to 21.5 min (di- and tripeptides); and F4, from 21.5 to 32.0 min (free amino acids). These results are similar to results obtained with different protein sources, such

as casein (Morais et al., 2005), milk (Lopes et al., 2005), rice (Lopes et al., 2008), whey (De Souza et al., 2008), wheat flour (Carreira et al., 2011) and WPC (Silvestre et al., 2011).

As shown in Table 3, there was a significant variation in the peptide and free amino acid contents among the different WPC hydrolysates. To choose the most appropriate hydrolysates for the development of nutritional supplements for clinical use, previous studies must be considered. During the metabolism of proteins, the first stage of hydrolysis leads to the formation of free amino acids (AA) and small peptides (2-6 AA residues), which can be further hydrolyzed by the brush border peptidases to produce AAs and di- and tripeptides (Hinsberger and Sandhu, 2004). The AA may be absorbed either in free form, by simple or facilitated diffusion (membrane transporters), or as di- and tripeptides (oligopeptide carriers) (Gilbert et al. 2008). Further, according to Frenhani and Burini (1999), the di- and tripeptides are more efficiently absorbed than an equivalent mixture of free amino acids.

In this way, it can be inferred that the best peptide profiles, from the nutritional point of view, were obtained for the hydrolysates H3, H4 and H5, prepared using the *B. licheniformis* protease, because they exhibited the highest content of di-and tripeptides and the smallest of large peptides. Additionally, the results in table 3 confirm the low DH values obtained by the osmometry method when using the *B. licheniformis* protease.

Correlation between the degree of hydrolysis and the peptide profiles

The results of the correlation (r) between the DH and the chromatographic fractions of the WPC hydrolysates are shown in Table 4. For some hydrolysates, a significant correlation ($p < 0.05$) between the DH and the content of peptides and free amino acids can be observed. Additionally, the intensity of the correlation changed with either the method of determination or the enzyme. According to Sampaio, 2002), r values above 0.7 with $p < 0.05$ indicate a

strong association between the two parameters, i.e., the DH and the peptide distribution.

Regarding the *B. licheniformis* protease, a strong positive correlation between the contents of di- and tripeptides (F3) and the DH obtained by all the methods is observed. Additionally, for three of the tested methods (formaldehyde, osmometry and soluble protein content), the same type of correlation occurred between the DH and the free amino acid content (F4), and a negative correlation was observed between the DH and the large peptide content (F1). With respect to the *A. sojae* protease, there was a strong positive correlation between the di- and tripeptide content (F3) and the DH obtained by the three methods (formaldehyde, OPA and soluble protein content). Furthermore, the soluble protein content method was negatively correlated with the large peptide content (F1).

In summary, these results indicate that in most cases, the increase in the hydrolysis time of WPC proteins produced more small peptides and free amino acids and less large peptides.

Considering that among the fractions for which it was detected a strong positive correlation with the DH, the F3 (di- and tripeptides) is the most important to evaluate the nutritional value of protein hydrolysates, it can be concluded that for the *B. licheniformis* protease all tested methods could be used to screen hydrolysates for the preparation of food formulas, especially the formaldehyde method, which had the highest r value (0.9195). For *A. sojae* protease, only the osmometry method would not be suitable for this purpose.

No report was found in the literature correlating the DH of WPC hydrolysates and the peptide profile.

CONCLUSION

The degree of hydrolysis of WPC hydrolysates changed with the type of method used to evaluate this parameter and the highest values were obtained with the soluble protein content method for the *B. licheniformis* protease and with the OPA method for the *A. sojae* protease. For both enzymes, the formaldehyde method was considered the most suitable for evaluating the DH of WPC hydrolysates because it showed the most pronounced variation of the results with the reaction time. For the *A. sojae* protease, the same was observed when using the OPA method. With respect to the peptide profile, the action of the *B. licheniformis* protease was more advantageous than *A. sojae* protease because it produced protein hydrolysates with higher content of di- and tripeptides and lower of large peptides.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank CNPq, CAPES and FAPEMIG for their financial support.

REFERENCES (48)

Adler-Nissen, J., 1986. Enzymic Hydrolysis of Food Proteins. Elsevier Applied Sci. Pub. Ltd, London, Pages: 427.

AOAC, 1995. Official Methods of Analysis of AOAC international. 16th Edn., AOAC International, Arlington. Pages: 1298.

Ayres, M., M. Ayres Jr., D.L. Ayres and A.A.S. Santos, 2007. BioEstat: Statistical Applications in the Biomedical Sciences Areas. Mamiraua Civil Society, Belem.

Cao, W., C. Zhang, P. Hong and H. Ji, 2009. Optimising the free radical scavenging activity of shrimp protein hydrolysate produced with Alcalase using response surface methodology. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 44: 1602-1608.

Carrasco, C.A. and M. Guerra, 2010. Whey as a source of bioactive peptides. *Anales Ven. Nutrición*, 23: 42-49.

Carreira, R.L., C.B.D. Ornellas, H.A. Morais, S. Da Motta and M.P.C. Silvestre, 2003. Influence of precipitation and ultrafiltration on the peptide profile of casein hydrolysates. *Cienc. Agrotec.*, 27: 414-421.

Carreira, R.L., V.D.M. Silva, L.G. Lima, H.A. Morais and M.P.C. Silvestre, 2011. Peptide profile of protein hydrolysates from wheat flour. *Pesq. Agropec. Trop.*, 41: 481-489.

Cheison, S.C., S.B. Zhang, Z. Wang and S.Y. Xu, 2009. Comparison of a modified spectrophotometric and the pH-stat methods for determination of the degree of hydrolysis of whey proteins hydrolysed in a tangential-flow filter membrane reactor. *Food Res. Int.*, 42: 91-97.

Church, F.C., H.E. Swaisgood, D.H. Porter and G.L. Catignani, 1983. Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *J. Dairy Sci.*, 66: 1219-1227.

Denis, A., N. Brambati, B. Dessauvages, S. Guedj, C. Ridoux, N. Meffre and C. Autier, 2008. Molecular weight determination of hydrolyzed collagens. *Food Hydrocoll.*, 22: 989-994.

Doucet, D., S.F. Gauthier, D.E. Otter and E.A. Foegeding, 2003. Enzyme-induced gelation of extensively hydrolyzed whey proteins by alcalase: Comparison with the plastein reaction and characterization of interactions. *J. Agri. Food Chem.*, 51: 6300-6308.

Doucet, D., S.F. Gauthier and E.A. Foegeding, 2001. Rheological characterization of a gel formed during extensive enzymatic hydrolysis. *J. Food Sci.*, 66: 711-715.

Dzwolak, W. and S. Ziajka, 1999. Enzymatic hydrolysis of milk proteins under alkaline and acidic conditions. *J. Food Sci.*, 64: 393-395.

Ferreira, D.F., 2011. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciê. Agrotecnol.*, 35: 1039-1042.

Frenhani, P.B. and R.C. Burini, 1999. Mechanisms of amino acids and oligopeptides absorption in humans. *Arq. Gastroent.*, 36: 227-237.

Gilbert, E.R., E.A. Wong and K.E. Webb Jr., 2008. Peptide absorption and utilization: Implications for animal nutrition and health. *J. Animal Sci.*, 86: 1493-1501.

Guadix, A., M. Guadix, M.P. Paez-Duenas, P. Gonzalez-Tello and F. Camacho, 2000. Technological processes and methods of control in the hydrolysis of proteins. *Ars Pharm.*, 41: 79-89.

Gupta, R., Q. Beg and P. Lorenz, 2002. Bacterial alkaline proteases: Molecular approaches and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 59: 15-32.

Hartree, E.F., 1972. Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.*, 48: 422-427.

Hinsberger, A. and B.K. Sandhu, 2004. Digestion and absorption. *Curr. Paediatr.*, 14: 605-611.

Hoyle, N.T. and J.H. Merritt, 1994. Quality of fish protein hydrolysate from herring (*Clupea harengus*). *J. Food Sci.*, 59: 76-79.

Ju, Z.Y., J. Otte, J.S. Madsen and K.B. Qvist, 1995. Effects of limited proteolysis on gelation and gel properties of whey protein isolate. *J. Dairy Sci.*, 78: 2119-2128.

Leonil, J., V. Ganaire, D. Molle, S. Pezennec and S. Bouhallab, 2000. Application of chromatography and mass spectrometry to the characterization of food proteins and derived peptides. *J. Chromatog. A*, 881: 1-21.

Levy, M., 1935. Equilibria of the basic amino acids in the formol titration. *J. Biol. Chem.*, 109: 365-381.

Lopes, D.C.F., C.S. Bizzotto, R.L. Carreira, W.O. Afonso, C.O. Lopes Jr. and M.P.C. Silvestre, 2008. Removal of phenylalanine from protein hydrolysates prepared with rice. *J. Food Technol.*, 6: 57-65.

Lopes, D.C.F., F.M. Delvivo and M.P.C. Silvestre, 2005. Hydrolysates of skim milk. Peptide profiles using two proteolytic enzymes. *Brit. Food J.*, 107: 42-53.

Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.

Morais, H.A., L.M. De Marco, M.C. Oliveira and M.P.C. Silvestre, 2005. Casein hydrolysates using papain: peptide profile and encapsulation in liposomes. *Acta Alim.*, 34: 59-69.

NC-IUBMB, 2010. Enzyme nomenclature: recommendations of the NC-IUBMB on the nomenclature and classification of enzymes by the reactions they catalyse. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology, <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>

Nielsen, P.M., D. Petersen and C. Dambmann, 2001. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *J. Food Sci.*, 66: 642-646.

Otte, J., Z.Y. Ju, A. Skriver and K.B. Qvist, 1996. Effect of limited proteolysis on the microstructure of heat-induced whey proteins. *Int. Dairy J.*, 79: 782-790.

Pacheco, M.T.B. and V.C. Sgarbieri, 2005. Effect of different hydrolysates of whey protein on hepatic glutathione content in mice. *J. Med. Food*, 8: 337-342.

Pimentel-Gomes, F., 2000. Course of experimental statistics. 14th Edn. Nobel, Piracicaba.

Rawlings, N.D., A.J. Barrett and A. Bateman, 2010. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.*, 38: D227-D233.

Roth, M., 1971. Fluorescence reaction for amino acids. *Anal. Chem.*, 43: 880-882.

Sampaio, I.B.M., 2002. Statistics applied to animal testing. 2th Edn., FEPMVZ, Belo Horizonte.

Silva, M.C., V.D.M. Silva, A.M.Q. Lana and M.P.C. Silvestre, 2009. Degree of hydrolysis and peptide profile of enzymatic hydrolysates obtained from whey protein concentrate. *Alim. Nut.*, 20: 395-402.

Silvestre, M.P.C., 1997. Review of methods for the analysis of protein hydrolysates. *Food Chem.*, 60: 263-271.

Silvestre, M.P.C., M. Hamon and M. Yvon, 1994a. Analyses of protein hydrolysates. 1. Use of poly (2-hydroxyethyl-aspartamide)-silica column in size-exclusion chromatography for the fractionation of casein hydrolysates. *J. Agric. Food Chem.*, 42: 2778-2782.

Silvestre, M.P.C., M. Hamon and M. Yvon, 1994b. Analyses of protein hydrolysates. 2. Characterization of casein hydrolysates by a rapid peptide quantification method. *J. Agric. Food Chem.*, 42: 2783-2789.

Silvestre, M.P.C., W.D.O. Afonso, C. de Oliveira Lopes Jr., V.D.M. Silva, H.A. Morais, M.W.S. de Souza and M.R. Silva, 2011. Use of subtilisin and pancreatin for hydrolyzing whey protein concentrate. *Am. J. Food Technol.*, 6: 647-660.

Smithers, G.W., 2008. Whey and whey proteins-From gutter-to-gold. *Int. Dairy J.*, 18: 695-704.

De Souza, M.W.S., E.A.R. Biasutti, R.L. Carreira, W.O. Afonso, V.D.M. Silva and M.P.C. Silvestre, 2008. Obtaining oligopeptides from whey: Use of subtilisin and pancreatin. *Am. J. Food Technol.*, 3: 315-324.

Spellman, D., E. Mcevoy, G. O'Cuinn and R.J. Fitzgerald, 2003. Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: comparison of the TNBS, OPA e pH-stat method for quantification of degree of hydrolysis. *Int. Dairy J.*, 13: 447-453.

Stat Soft, 2000. STATISTICA for Windows [Computer program manual]. Stat Soft, Inc., Tulsa.

Wong, T.M. and C.O.L. Boyce, 1988. Monitoring Proteolysis by Osmometry: A Rapid Method. In: Methods for Protein Analysis, Cherry J.P. and R.A. Barford (Eds.). American Oil Chemists Society, Champaign, USA.

Zhao, X. and Y. Hou, 2009. Limited hydrolysis of soybean protein concentrate and isolate with two proteases and the impact on emulsifying activity index of hydrolysates. Afr. J. Biotech., 8: 3314-3319.

Zheng, H., C. Zhang, W. Cao, S. Liu and H. Ji, 2009. Preparation and characterization of the pearl oyster (*Pinctada martensii*) meat protein hydrolysates with a high Fischer ratio. Int. J. Food Sci. Technol., 44: 1183-1191.

Table 1: Hydrolytic conditions used in preparing WPC hydrolysates

Hydrolysates	Enzyme type	Reaction time (h)	pH	Temperature
H1	Protease from <i>Bacillus</i> <i>licheniformis</i>	1	8.0	60 °C
H2		2		
H3		3		
H4		4		
H5		5		
H6	Protease from <i>Aspergillus sojæ</i>	1	7.0	50 °C
H7		2		
H8		3		
H9		4		
H10		5		

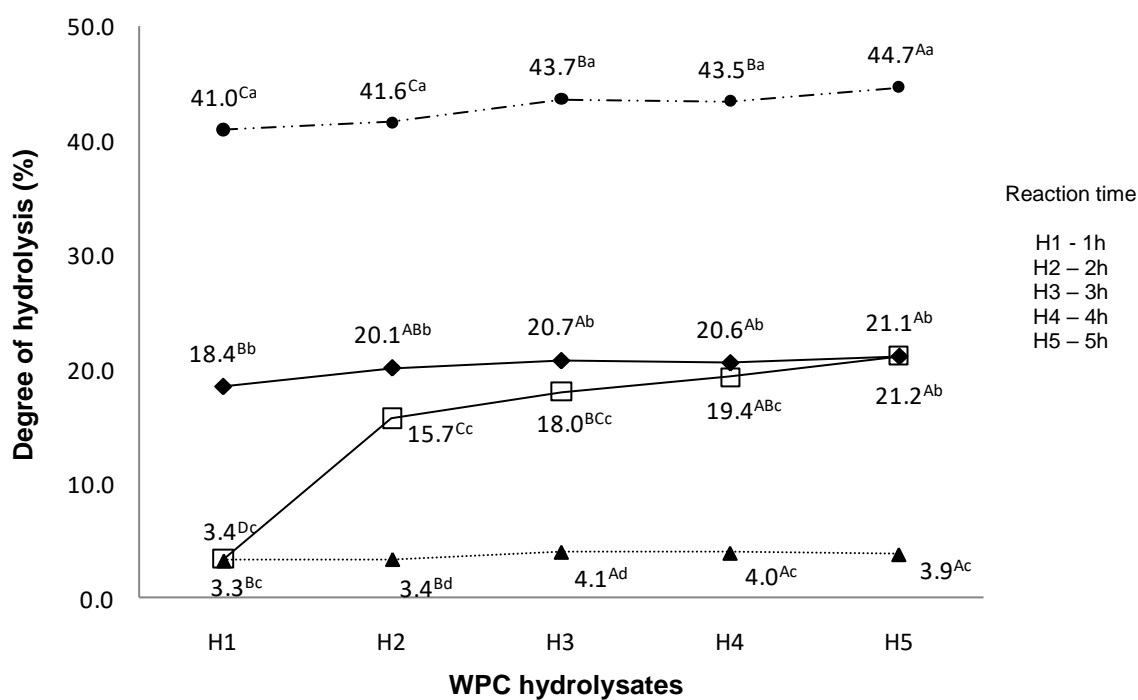


Figure 1: Degree of hydrolysis of WPC hydrolysates obtained by the action of *Bacillus licheniformis* protease. Methods of formol titration (□), derivatization with orthophthalaldehyde (◆), osmometry (▲) and soluble protein content (●). The results represent the means of triplicate experiments. Different capital letters represent significantly different ($p < 0.05$) values for a same method and different hydrolysates. Small letters represent significantly different ($p < 0.05$) values for a same hydrolysate and different methods.

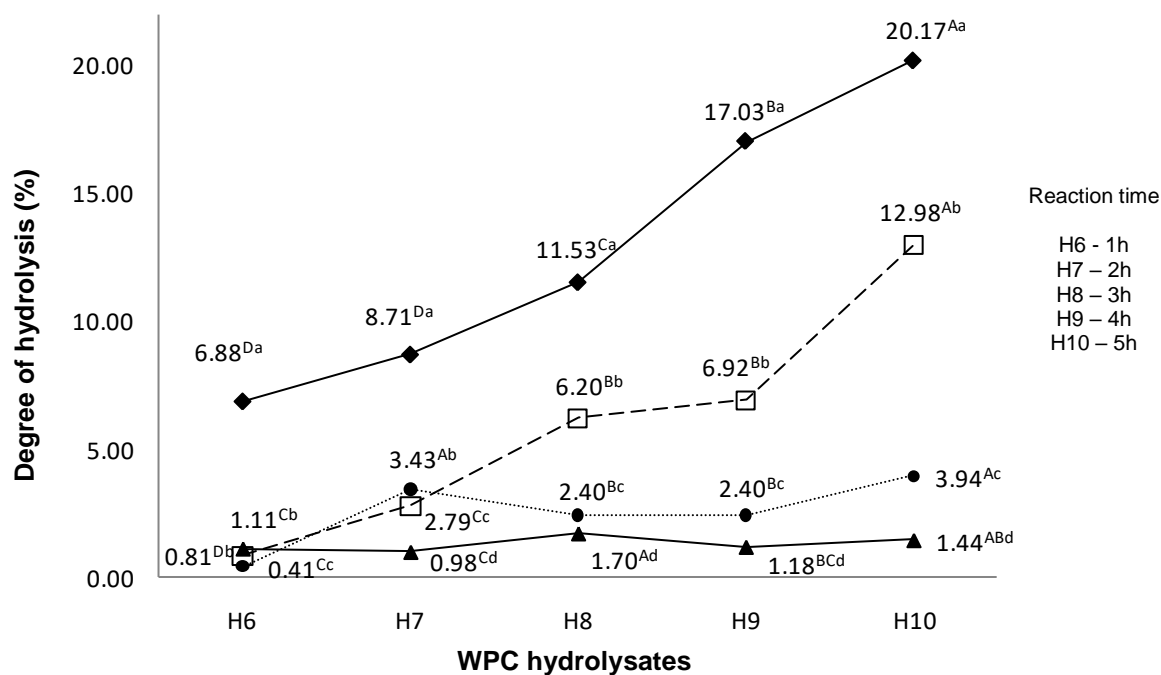


Figure 2: Degree of hydrolysis of WPC hydrolysates obtained by the action of *Aspergillus sojae* protease. Methods of formol titration (□), derivatization with orthophthalaldehyde (◆), osmometry (▲) and soluble protein content (●). The results represent the means of triplicate experiments. Different capital letters represent significantly different ($p < 0.05$) values for the same method and different hydrolysates. Small letters represent significantly different ($p < 0.05$) values for the same hydrolysate and different methods.

Table 2: Correlation among the methods for the evaluation of the degree of hydrolysis

Comparisons	Protease from <i>Bacillus licheniformis</i>		Protease from <i>Aspergillus sojae</i>	
	r^a	p^b	r^a	p^b
Formaldehyde with OPA ^c	0.6492	0.0088	0.9300	< 0.0001
Formaldehyde with Osmometry	0.6641	0.0069	0.5201	0.0468
Formaldehyde with Soluble Protein	0.8245	0.0002	0.6868	0.0047
OPA ^c with Osmometry	0.7650	0.0009	0.3259	0.2357
OPA ^c with Soluble Protein	0.5471	0.0347	0.6243	0.0128
Osmometry with Soluble Protein	0.7305	0.0020	0.1550	0.5812

^ar: correlation; ^bp: determined by t-Student test with significant differences for $p < 0.05$;

^cOPA: ortophtalaldehyde.

Table 3: Peptide and free amino acid content in chromatographic fractions of WPC hydrolysates

Hydrolysates	Reaction time (h)	F1 ^a	F2 ^b	F3 ^c	F4 ^d
<i>Protease from Bacillus licheniformis</i>					
H1	1	63.08 ^C	36.27 ^B	0.37 ^E	0.27 ^E
H2	2	60.26 ^C	35.24 ^B	3.90 ^B	0.60 ^E
H3	3	50.89 ^D	39.36 ^B	8.47 ^A	1.28 ^D
H4	4	53.57 ^D	36.87 ^B	8.25 ^A	1.30 ^D
H5	5	44.61 ^E	45.40 ^A	8.79 ^A	1.20 ^D
<i>Protease from Aspergillus sojae</i>					
H6	1	97.13 ^A	1.23 ^C	1.50 ^D	0.13 ^F
H7	2	95.42 ^A	1.98 ^C	0.41 ^E	2.18 ^{BC}
H8	3	94.81 ^A	2.25 ^C	0.65 ^E	2.28 ^B
H9	4	92.90 ^{AB}	2.87 ^C	2.45 ^C	1.77 ^C
H10	5	89.73 ^B	4.63 ^C	0.83 ^E	4.81 ^A

Values are in % of nmol of the four fractions and represent the means of triplicate. Different numbers represent significantly different ($p < 0.05$) values for different fractions of the same hydrolysate. ^aF1: large peptides (> 7 amino acid residues); ^bF2: medium peptides (4 to 7 amino acid residues); ^cF3: di- and tripeptides; ^dF4: free amino acids. Different letters (A, B, C) represent significantly different ($p < 0.05$) values for the same fraction of different hydrolysates.

Table 4: Correlation between the degree of hydrolysis and the peptide profiles of WPC hydrolysates.

Degree of hydrolysis (method)	Chromatographic fractions	Protease from <i>Bacillus licheniformis</i>		Protease from <i>Aspergillus sojae</i>	
		r ^a	p ^b	r ^a	p ^b
Formaldehyde	F1 ^d	-0.7726	0.0007	-0.3742	0.1693
	F2 ^e	0.4573	0.0865	-0.0504	0.8586
	F3 ^f	0.9195	<0.0001	0.9142	<0.0001
	F4 ^g	0.8125	0.0002	0.2120	0.4481
OPA ^c	F1	-0.0606	0.0166	-0,3087	0.2629
	F2	0.3648	0.1812	-0,0260	0.9267
	F3	0.7073	0.0032	0,7933	0.0004
	F4	0.6769	0.0056	-0,2615	0.3464
Osmometry	F1	-0.6135	0.0150	-0.1132	0.6879
	F2	0.2368	0.3955	-0.1539	0.5838
	F3	0.8719	<0.0001	0.4553	0.0881
	F4	0.8877	<0.0001	-0.0620	0.8264
Soluble Protein Content	F1	-0.8683	<0.0001	-0.7498	0.0013
	F2	0.6088	0.0160	0.4673	0.0789
	F3	0.9133	<0.0001	0.8798	<0.0001
	F4	0.8326	0.0001	-0.6755	0.0057

^ar: correlation; ^bp: determined by t-Student test with significant differences for p < 0.05;

^cOPA: ortophtalaldehyde; ^dF1: large peptides (> 7 amino acid residues); ^eF2: medium peptides (4 to 7 amino acid residues); ^fF3: di- and tripeptides; ^gF4: free amino acids.

5.3 Action of a pancreatin and an *Aspergillus oryzae* protease on whey protein concentrate: correlation among methods of analysis of the enzymatic hydrolysates

Harriman Aley Morais, Marialice Pinto Coelho Silvestre, Josianne Nicácio Silveira, Ana Cristina Simões e Silva, Viviane Dias Medeiros Silva, Mauro Ramalho Silva

M.P.C. Silvestre*

Federal University of Minas Gerais, Av. Pres. Antonio Carlos, 6627, CEP 31270-901. Belo Horizonte, MG, Brazil.

Edetec Food Industry S/A., Av. José Cândido da Silveira, 2100, CEP 31035-536, Belo Horizonte, MG, Brazil. Phone: +55 31 3486 4167. E-mail: malice@ufmg.br

H.A. Morais

Federal University of Minas Gerais, CEP 31270-901. Belo Horizonte, MG, Brazil.

Federal University of Jequitinhonha and Mucuri Valleys, 39100-000, Diamantina, MG, Brazil.

J.N. Silveira, A.C. Simões e Silva

Federal University of Minas Gerais, CEP 31270-901. Belo Horizonte, MG, Brazil.

V.D.M. Silva, M.R. Silva

Edetec Food Industry S/A., Av. José Cândido da Silveira, 2100, CEP 31035-536, Belo Horizonte, MG, Brazil.

Abstract

Improvement of the use of whey proteins can be achieved by the hydrolytic treatment. The aim of this study was to hydrolyze whey protein concentrate (WPC) and to assess the degree of hydrolysis (DH) and the peptide profile of the enzymatic hydrolysates obtained by the action of a pancreatin and an *Aspergillus oryzae* protease. Ten hydrolysates were prepared at different reaction times (1, 2, 3, 4 and 5 h), and a correlation between the DH and the peptide profile was established. The highest DH (36.41%) was shown by the hydrolysate prepared with pancreatin for 3 h, using the protein content method. Positive correlations with strong and significant intensity between the methods of formaldehyde and orthophthalaldehyde (OPA), formaldehyde and osmometry as well as osmometry and OPA were observed when using pancreatin. Similar results were obtained between OPA and soluble protein content for the *Aspergillus oryzae* protease. The action of pancreatin also produced the best peptide profile, giving rise to the highest contents of di- and tripeptides (9.07%, 7.12% and 6.46%) and the lowest contents of large peptides (42.43%, 41.33% and 41.13%), after 3, 4 and 5 h of hydrolysis, respectively. Regarding the DH with pancreatin measured by formol titration and by OPA, it was positively correlated with medium peptide content and negatively correlated with large peptide content. In the case of the *Aspergillus oryzae* protease, only a strong negative correlation was observed between the concentration of large peptides and the DH measured by the OPA method.

Keywords: Whey, Protein Hydrolysates, Degree of Hydrolysis, Peptides, Pancreatin, *Aspergillus Oryzae* Protease.

Introduction

Cheese manufactures generate whey, a byproduct that is considered an industrial waste with low added value in several countries. The main destination of whey is disposal in waterways or use as animal feed [1, 2]. Exponential value can be added to whey by employing the enzymatic hydrolysis of proteins because this process increases the nutritional value of whey and improves the functional, technical, physiological and bioactive properties of its proteins [3, 4].

The extent of proteolysis can be evaluated by the degree of hydrolysis (DH), referring to the percentage of cleaved peptide bonds in proteins. In the current study, four techniques, based on different principles, were used for the assessment of the DH: 1) formol titration, based on an acid-base titration; 2) determination of soluble protein content in the presence of a precipitating agent; 3) reaction of the α -amino groups that are released during hydrolysis with orthophthalaldehyde; and 4) detection of the freezing point of solutions by osmometry.

The choice of these methods was based on the fact that although there have been many studies on the determination of the DH for whey proteins, there are far fewer data in the literature comparing the methods used for assessing this parameter, especially for techniques that are based on different principles. Moreover, in these studies, the comparisons had been carried out only between methods based on the reaction of α -amino groups with either derivatizing agent [5] or the pH stat method [4, 6].

Moreover, the current work is the first to assess the degree of hydrolysis of WPC hydrolysates obtained by the action of a pancreatin and an *Aspergillus oryzae* protease. Furthermore, this was the first study to use soluble protein content and osmometry for both enzymes and the OPA method for the *Aspergillus oryzae* protease. Additionally, in the present work, an attempt was made to explain the DH results obtained for each enzyme and for the four methods.

To the best of our knowledge, this is also the first report of a correlation among the four methods used in the present work to determine the degree of hydrolysis of WPC protein hydrolysates obtained by the action of pancreatin and an *Aspergillus oryzae* protease.

To use a protein hydrolysate for dietetic purposes, the size distribution of peptides needs to be characterized because the length of the peptide chain influences the rate of absorption. Several chromatographic techniques have been described in the literature, but they have shown some drawbacks, e.g., interactions between the solute and the stationary phase and inefficiency in separating small peptides [7]. For these reasons, our group [8, 9] has developed a method based on the fractionation of peptides by size exclusion high performance liquid chromatography, which allows the separation and quantification of peptides with molecular masses smaller than 1,000 Da; this technique was employed in the current work.

Notably, the correlation between the DH and the peptide profile of WPC hydrolysates has not previously been established.

The objectives of this study were as follows: to employ a pancreatin and an *Aspergillus oryzae* protease to hydrolyze WPC proteins; to evaluate the degree of hydrolysis using four different methods as well as the distribution of the peptides according to the chain size; and to establish correlations among the methods of DH determination and between the DH and the peptide profile.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Pancreatin (Corolase PP, activity of 5.97 U.mL⁻¹) and an *Aspergillus oryzae* protease (FlavourzymeTM, activity of 0.69 U.mL⁻¹) were kindly provided by AB Enzymes (Barueri, SP,

Brazil) and Novozymes (Araucária, PR, Brazil), respectively. In this study, the enzyme activity was defined as the amount of enzyme required to liberate 1 g of tyrosine in 1 min at 37 °C. WPC (Kerrylac 750) in powdered form was kindly provided by Kerry of Brazil Ltd. (Três Corações, MG, Brazil). Formic acid was purchased from Merck (Whitehouse Station, NJ, USA). Orthophthalaldehyde (OPA, Code P0657), 2-mercaptoethanol (code M6250) and Folin-Ciocalteu reagent (code F9252) were purchased from Sigma (São Paulo, SP, Brazil).

The tangential flow system with a 10 kDa cut-off membrane and the polyvinylidene fluoride membranes used for the filtration of the samples (0.22 µm) and solvents (0.45 µm) were purchased from Millipore (São Paulo, SP, Brazil). All other reagents used in this study were of analytical grade.

The HPLC system used for fractionating protein hydrolysates consisted of one isocratic pump and a UV-Vis detector (1200 Series, Agilent, Santa Clara, CA, USA) coupled to a computer with ChemStation software for LC Systems (Agilent, Santa Clara, CA, USA). A poly(2-hydroxyethylaspartamide)-silica (PHEA) column (250 x 9.4 mm, 5 µm and 200 Å pore size) was used for HPLC. The water for HPLC was purified by passage through a MilliQ water purification system (Millipore, Billerica, MA, USA).

Preparation of hydrolysates from whey protein concentrate

Ten WPC hydrolysates were prepared with (A) pancreatin, pH 7, 50 °C (H1 to H5) and (B) *Aspergillus oryzae* protease, pH 7, 50 °C (H6 to H10), varying the hydrolysis time (1, 2, 3, 4 and 5 h, respectively) for both enzymes. The pH (7.0) and temperature (50 °C) values corresponded to the optimal conditions for the enzymes, which were provided by the manufacturer.

The 10% (w/v) WPC solutions, which corresponded to 3.42% protein (w/v), were prepared in distilled water, and the pH was adjusted to 8.0 with a 3 mol L⁻¹ NaOH solution. Subsequently, the WPC solutions were heated in an oil bath with continuous stirring (stirrer model 752A from Fisatom, São Paulo, SP, Brazil), and the enzymes were added in an appropriate quantity to attain an enzyme:substrate ratio of 8.0:100 (w/w). The reaction time varied from 1 h to 5 h, and the hydrolytic reaction was stopped by heating the samples at 75 °C for 15 sec. The hydrolysates were immediately used for the determination of DH and then freeze-dried (Freeze Dry System/FreeZone 4.5, model 77500, Labconco, Kansas City, MO, USA) for characterization of the peptide profile. The hydrolysates were stored in the freezer (-20 °C) until analysis.

Determination of the degree of hydrolysis

In this study, the degree of hydrolysis was evaluated using four different methods. Two of the methods were based on the determination of α -amino nitrogen (formol titration and derivatization with OPA), and the other methods relied on the depression of the freezing point (osmometry) and on the quantification of the soluble protein content after precipitation with trichloroacetic acid. For each method, a blank using unhydrolyzed WPC was subjected to the same procedure that was used for the hydrolyzed samples.

Formol titration

The DH was calculated using the relationship between α -amino nitrogen (AN) and total nitrogen (TN) according to equation 1:

$$\% \text{ DH} = \frac{\alpha\text{-amino nitrogen (AN)}}{\text{total nitrogen (TN)}} \times 100 \quad (1)$$

The Sorensen method [10], which is based on titration with formaldehyde, was used for quantifying the AN. The formaldehyde 1 reagent was prepared by diluting 25 mL of the commercial solution with 50% ethanol to a final volume of 250 mL. The pH was adjusted to 7.0 with 0.2 mol L⁻¹ NaOH solution just prior to use. The pH of the hydrolysate solution was also adjusted to 7.0 with 0.2 mol L⁻¹ NaOH solution. Three milliliters of the formaldehyde reagent was added to 3 mL of the hydrolysate solution, and the mixture was stirred and titrated with a 0.2 mol L⁻¹ NaOH solution with phenolphthalein as an indicator of its final endpoint. An excess of the 0.2 mol L⁻¹ NaOH solution was added, and the solution was then back-titrated with a 0.2 mol L⁻¹ HCl solution until it became colorless. The required volumes of NaOH and HCl solutions were recorded. The TN was determined by the Kjeldahl method [10].

Derivatization with orthophthalaldehyde

For this analysis, the OPA reagent was prepared according to the method of Church et al. [11]. A 25 mL volume of sodium tetraborate solution (100 mmol L⁻¹) was mixed with 2.5 mL of 20% (w/v) sodium dodecyl sulfate solution, 40 mg of OPA (dissolved in 1 mL of methanol) and 100 µL of 2-mercaptoethanol. The volume was adjusted to 50 mL using type I water. The reagent was always prepared immediately before use and placed in a vial covered with aluminum foil to protect it from light.

The method described by Spellman et al. [6] was used with some modifications for the derivatization. A volume of 10 µL of the sample was mixed with 3.4 mL of the OPA reagent,

and this mixture was allowed to stand at 25 °C for 2 min. Subsequently, the absorbance was read at 340 nm. The degree of hydrolysis was calculated according to equation 2:

$$\text{DH (\%)} = \frac{(\text{ABS} \times 1,934 \times d)}{c} \quad (2)$$

where ABS is the absorbance of the samples, d is the dilution factor and c is the protein concentration of the sample (g L⁻¹).

Osmometry

For this analysis, a sample volume of 50 µL was immediately removed after the reaction to determine the freezing point, which was measured using a micro-osmometer (Precision System 5004, Spectrun, São Paulo, Brazil). The freezing point depression was used to determine the degree of hydrolysis according to equation 3, as proposed by Adler-Nissen [12]:

$$\text{GH (\%)} = \left(\frac{\Delta C}{\text{P\%} \times f_{\text{osm}}} \right) \times \left(\frac{1}{\omega} \right) \times \left(\frac{1}{h_{\text{tot}}} \right) \times 100 \quad (3)$$

where ΔC is the osmolarity (mOsmol L⁻¹), P% is the protein concentration (g of protein/kg of water), $1/\omega$ is the calibration factor of the osmometer, representing the reciprocal of the osmotic coefficient of peptides, typically a constant value of 1.04, and h_{tot} is the total number of peptide bonds in the protein, which is 8.8 mEq g⁻¹ of protein for whey.

Soluble protein content in trichloroacetic acid

The degree of hydrolysis of WPC was also determined by the percentage of soluble protein in 10 g% trichloroacetic acid (TCA) in relation to the total protein content of the sample according to the method of Hoyle and Merritt [13], with modifications. Hydrolysate aliquots of 500 μL were mixed with 500 μL of a 20 g% TCA solution to obtain soluble and insoluble fractions in 10 g% TCA. After 30 min of incubation at room temperature, the mixture was centrifuged at 3000 x *g*. The soluble protein content of the supernatant was determined by the method of Lowry et al. [14], which was modified by Hartree [15], and the result was expressed as mg of protein. Bovine serum albumin was used as the standard. The degree of hydrolysis was calculated according to equation 4:

$$\text{DH (\%)} = \frac{\text{soluble protein content in 10 g\% TCA (mg)} \times 100}{\text{total protein content (mg)}} \quad (4)$$

Characterization of peptide profiles from WPC hydrolysates

The characterization of peptide profiles was performed in two stages, which included the fractionation of peptides by size and their subsequent quantification. The fractionation of WPC hydrolysates was performed by size exclusion (SE) HPLC on a PHEA column, according to the method previously developed by our group [8], using 0.05 mol L⁻¹ formic acid (pH 2.5) as the mobile phase and isocratic conditions at a flow rate of 0.5 mL min⁻¹ for 35 min. The samples were dissolved in the mobile phase (0.1% w/v) and filtered through a 0.22 μm membrane, and 50 μL of these solutions were injected onto the column. The mobile phase was filtered through a 0.45 μm membrane and degassed by sonication in an ultrasound bath (USC1400 model, Unique, Santo Amaro, SP, Brazil) for 30 min prior to use.

The rapid method of Correct Fraction Area (CFA), which was previously developed by our group [9], was used to quantify the peptides and free amino acids in the SE-HPLC fractions of the WPC hydrolysates. Briefly, five whey standard hydrolysates (two using trypsin and three using pancreatin) were prepared and then fractionated into four fractions by SE-HPLC, as described above. The four fractions were collected (Fraction Collector, CF-1 model, Spectrum Chrom, Houston, TX, USA) and submitted for amino acid analysis following solvent removal (Centrivap, 78100-00D model, Labconco, Kansas City, MO, USA). The calculation of CFA was performed using specific formulas after detection at three wavelengths (230, 280 and 300 nm) to remove the contribution of aromatic amino acids. A standard curve was drawn to correlate CFA with the amino acid contents of the fractions.

Statistical analysis

All determinations were performed in three replicates, each measured by triplicate analysis. To verify significant hydrolysis effects among the different treatments, a completely randomized design was adopted using a split-plot (4 x 6 method hydrolysis times) analysis scheme, and the results were analyzed with SISVAR version 5.3 software [16]. An experimental design consisting of complete randomization was adopted for the factorial analysis (2 x 6 enzyme hydrolysis times) of the peptide profiles, and the results were analyzed with Statistica software. The ANOVA and Duncan tests at 5% probability were used to determine differences between the means of the degree of hydrolysis as well as the contents of peptides and free amino acids in the WPC hydrolysates. Significant differences ($p < 0.05$) between the means were evaluated by Duncan's test [17]. Correlations between the degrees of hydrolysis obtained by the different methods with the contents of the peptides and free amino acids were obtained by the Pearson's correlation coefficient (r), which measures the degree of

association between two variables; p was calculated by t-tests, using BioStat software [18] for data analysis.

RESULTS AND DISCUSSION

Influence of the methods on the degree of hydrolysis

Regarding pancreatin action, a wide range of values of DH can be observed in Figure 1, depending on the type of method used in this analysis. The results of the DH of the samples were deducted by the DH values of the blank (26.6% for OPA, 8.4% for soluble protein content, 6.7% for formol titration and 7.4% for osmometry). The highest result (36.44%) was obtained for the H3 hydrolysate using the soluble protein content method. Indeed, for all hydrolysates (H1 to H5), the highest values were obtained by this method and were much higher than those obtained by the other three methods (OPA, osmometry and formol titration).

Using the soluble protein content method, the addition of trichloroacetic acid results in partial or total precipitation of non-hydrolyzed proteins and high molecular mass peptides [19], resulting in a higher concentration of soluble free amino acids and small peptides in the supernatant. Furthermore, according to Zaia et al. [20], the principle of the Lowry method, which was employed in this study for the determination of soluble proteins, is based on the reduction of the Folin-Ciocalteu reagent. The reduction takes place either when the side chains of certain amino acids donate four electrons or when two electrons are removed from each tetrapeptide unit of the peptides and proteins, which is facilitated by the formation of a chelate between copper and peptides/proteins. Considering that pancreatin is an enzymatic preparation containing enzymes with endopeptidase (trypsin and chymotrypsin) and exopeptidase (carboxypeptidases) activities [21] with high activity (5.97 U mL^{-1}), its action

may have led to an efficient hydrolysis of WPC, resulting in a large content of small peptides. These peptides remain soluble after the addition of trichloroacetic acid, producing high DH values with the soluble protein content method.

After the soluble protein content method, the method that produced the highest values of DH with pancreatin was formol titration, whose result was only inferior to that obtained by the OPA method for H1 (Figure 1). The action of two enzymes found in the pancreatin preparation could explain the higher DH values obtained by the formaldehyde method in relation to OPA for most of the samples. One enzyme is trypsin, which preferably cleaves peptide bonds containing residues of lysine or arginine, and the other enzyme is chymotrypsin, which hydrolyzes peptide bonds with basic or aromatic amino acids [22-24]. The action of these enzymes most likely increased the exposure of basic amino acid residues whose side chains also have protons that can be released by the addition of formaldehyde [25, 26].

The OPA method produced the third highest DH value, as demonstrated in Figure 1 for pancreatin. When using the OPA method, it is important to note that although whey proteins have a high percentage of lysine, whose ϵ -amino group can also react with the derivatizing agent leading to an overestimation of DH [11], they are also rich in cysteine, which reacts weakly and unstably with OPA, and may reduce the DH of WPC hydrolysates [6]. This explains, at least in part, the third position occupied by the OPA method in terms of DH value.

The practically constant values of DH obtained by the OPA method in the present study could be attributed to the fact that while the actions of trypsin and chymotrypsin found in pancreatin would lead to a greater exposure of lysine [22-24], thus increasing the DH, the action of carboxypeptidase A would increase the content of free sulfhydryl groups by the

release of cysteine and low molecular weight peptides containing cysteine [27], thus leading to lower DH values.

Other authors have also used the OPA method for evaluating the DH of WPC proteins hydrolyzed by pancreatin. Using different hydrolytic conditions of the present study (pH 8, 37 °C, E:S 1:50, reaction time of 8:30 h), Smyth and FitzGerald [28] have reported a maximum DH of 11.5%, which is lower than the values obtained in the current work (21.33 to 22.48%). The higher results obtained here could be explained by the addition of 2-mercaptoethanol. According to Roth [29], the reaction of cysteine with OPA can be optimized when the reagent is mixed with a solution of amino acids in the presence of a strong reducing agent.

Among the methods used in the current work, osmometry exhibited the lowest DH results (from 3.26 to 4.02%) when using pancreatin (Figure 1). This method is based on the relationship between the number of hydrolyzed peptide bonds and the osmolarity of the solution, which is evaluated by measuring the freezing point depression as a function of the number of soluble molecules in the sample [30, 31]. Therefore, a likely explanation for these low values is related to the ability of pancreatin, an enzyme of broad specificity, to increase the exposure of aromatic or basic amino acid residues [22, 32]. This would cause a pH change in the solution, leading to the aggregation of peptides and, consequently, gradually increasing the viscosity and turbidity of the solution [33].

There are no reports in the literature using soluble protein content, osmometry or formaldehyde to assess the degree of hydrolysis of WPC by the action of pancreatin.

As shown for pancreatin, a wide range of DH values were also observed for *Aspergillus oryzae* protease, which varied with the method used (Figure 2). The DH values of the blank (26.6% for OPA, 8.4% for soluble protein content, 6.7% for formaldehyde and 7.4% titration for osmometry) were subtracted from the DH values of the samples. It is noteworthy that for this enzyme, the influence of the method on the DH results showed a similar ranking as

pancreatin, *i.e.*, higher DH values were obtained with the soluble protein content method, followed in order by formol titration, the OPA method and osmometry.

For all hydrolysates (H6 to H10), the DH results obtained by the soluble protein content method were superior to those found for the other three methods, except for H10, where no significant difference was observed with the formol titration results (Figure 2). As the *Aspergillus oryzae* protease (Flavourzyme™) has endo- and exopeptidase activities, its action may have released considerable amounts of soluble small peptides, which would have reduced the Folin-Ciocalteu reagent [20], resulting in higher DH values obtained by the soluble protein content method.

The lower DH results obtained with the *Aspergillus oryzae* protease by the soluble protein content method compared to pancreatin could be explained, at least in part, by the predominant activity of the exopeptidase of the *Aspergillus oryzae* protease (Flavourzyme™) [28, 34] as well as its lower activity (0.69 U mL^{-1}). Furthermore, the action of the *Aspergillus oryzae* protease may have resulted in less protein breakdown than pancreatin, leading to a reduced amino acid content in the supernatant and, consequently, the inferior degree of hydrolysis measured by this method.

After the soluble protein content method, the method that produced the highest DH values with the *Aspergillus oryzae* protease was formol titration, whose results were only inferior to that obtained for H6 by the OPA method (Figure 2). The use of formol titration for assessing the degree of hydrolysis is based on the fact that the reaction of the sample with formaldehyde releases a proton (H^+) from the free amino group that can be titrated with an alkaline solution. Thereafter, the amount of alkali added, after subtraction of the blank value, is considered to be equivalent to the amount of α -amino groups present in the protein solution [35]. However, the release of certain amino acids with titrated side chains and the buffering capacity of the amino groups might interfere with this titration [25].

Although the low activity of the *Aspergillus oryzae* protease could have led to a lower cleavage of the protein molecule and resulted in a lower amino acid content in the supernatant, according to Margot et al. [36], large peptides that are eventually released show no buffering capacity because the amino groups found in their peptide bonds do not accept protons. Thus, the number of amino groups released by the action of the *Aspergillus oryzae* protease may have been sufficient to react with the formaldehyde, allowing the titration of the protons that were released. This could partially explain the results found in the current study when this method was used to determine the degree of WPC hydrolysis.

As in the case of pancreatin, the lowest values of DH were found when osmometry was used to evaluate this parameter. Considering the low enzymatic activity of the *Aspergillus oryzae* protease, the action of this enzyme may have resulted in a less protein breakdown resulting in significant production of large peptides having a higher capacity for aggregation and gel formation [37]. This would change the viscosity of the samples, thus reducing the DH measured by osmometry.

There are no reports in the literature using soluble protein content, OPA, osmometry or formaldehyde to assess the degree of *Aspergillus oryzae* protease-mediated hydrolysis of WPC.

Influence of reaction time on the degree of hydrolysis

The effect of the reaction time on the DH is shown in Figure 1. For pancreatin, reaction time had no influence on the DH obtained by the soluble protein content, OPA and osmometry methods. The only change in the DH due to reaction time was observed for the formaldehyde method at the beginning of the reaction. A sharp increase (44.5%) was found when the reaction time increased from 1 h (17.20%) to 2 h (24.86%). From this point forward,

no significant differences were observed for up to 5 h of reaction time. These results indicate that the formaldehyde method is the most suitable among the tested methods for assessing the DH of WPC hydrolysates obtained by the action of a pancreatin, with the caveat that hydrolysis proceeds for a maximum of 2 h.

In the case of the *Aspergillus oryzae* protease, the effect of the reaction time on the extent of WPC hydrolysis was somewhat more evident than for pancreatin (Figure 2). The reaction time changed the DH not only measured by the formaldehyde method, but also when soluble protein content and OPA methods were used. When the reaction time was increased from 1 h to 2 h, there was a small increase in the DH, as measured by the soluble protein content (from 26.46% to 29.96%) and OPA (from 18.83% to 19.91%). For the formaldehyde method, the influence of the reaction time on the DH was greater and longer because a significant increase in the DH occurred when the reaction time increased from 1 h (15.14%) to 2 h (22.26%) and from 2 h to 3 h (26.50%).

The *Aspergillus oryzae* protease (Flavourzyme™) has both endo- and exopeptidase activities, with the latter being more predominant [28, 34]. Thus, the gradual increase of the DH measured by formol titration could be related, at least in part, to the gradual release of amino acids, whose pKa values are different when they are in the free form vs. the peptide form. This fact results in alterations of the reaction medium pH, thereby allowing the titration of the side chains of certain amino acids, as well as the reaction of free α -amino groups with formaldehyde [25, 26].

Taking into account the more pronounced variation of the DH results with the reaction time found for the formol titration compared to the other methods, this method could be considered to be the most suitable for the evaluation of the DH of WPC hydrolysates obtained by the action of an *Aspergillus oryzae* protease, as shown for pancreatin.

Only one report was found in the literature addressing the evaluation of the DH of WPC hydrolysates obtained by an *Aspergillus oryzae* protease. In contrast to the current work, Smyth and FitzGerald [28], using different hydrolytic conditions (pH 8, 37 °C, E:S ratio 1:50), found a significant variation between the DH obtained after 30 min (7.1%) and that obtained after 8 h (24.3%) of reaction when using the OPA method.

Correlation among the methods for evaluating the degree of hydrolysis

Table 1 shows the occurrence of a positive and significant correlation of strong intensity in three cases for pancreatin (formaldehyde with OPA, formaldehyde with osmometry and OPA with osmometry) and in only one case for the *Aspergillus oryzae* protease (OPA with soluble protein content), according to the values established by Sampaio [38], *i.e.*, $r > 0.7$ and $p < 0.05$.

There were no prior reports in the literature in which a correlation was evaluated among the same methods employed in this study to determine the DH of WPC hydrolysates obtained by the action of pancreatin and *Aspergillus oryzae* protease.

Peptide profile of WPC protein hydrolysates

The SE-HPLC technique used here proved to be efficient for fractionating the WPC hydrolysates, especially for peptides with molecular masses lower than 1,000 Da. The hydrolysates were resolved in four fractions: F1 - large peptides, with more than 7 amino acids residues; F2 - medium peptides, with 4 to 7 amino acids residues; F3 - di- and tripeptides and F4 - free amino acids. This result agrees with previous studies by our group using the same technique for fractionating enzymatic hydrolysates obtained from several

protein sources and varied hydrolytic conditions. Specifically, studies with casein [39], skim milk [40], whey [41, 42], rice [43] and wheat flour [44] can be highlighted.

Significant variations in the peptide profiles of the different hydrolysates are shown in Table 2. Aiming at choosing the most appropriate hydrolysates for the development of nutritional supplements for clinical use, previous studies were considered. During protein metabolism, the first stage of hydrolysis leads to the formation of free amino acids (AA) and small peptides (2-6 AA residues), which can be further hydrolyzed by brush border peptidases to produce AA and di- and tripeptides [23]. The amino acids can be absorbed either in the free form, by simple and facilitated diffusion (membrane transporters), or in the di- and tripeptide form (oligopeptide transporters) [45]. Furthermore, according to Frenhani and Burini [46], the di- and tripeptides are more efficiently absorbed than is an equivalent mixture of free amino acids.

From a nutritional point of view, hydrolysates H3, H4 and H5, prepared using pancreatin, showed the best peptide profiles. Hydrolysate H3 had a higher di- and tripeptide content, whereas H4 and H5 had higher amount of free amino acids. The quantity of large peptides was similar for these three hydrolysates.

Correlation between the peptide profile and the degree of hydrolysis

A significant correlation ($p < 0.05$) between the DH and the content of peptides and free amino acids was found for some hydrolysates (Table 3). However, the intensity of the correlation (r) varied depending on the type of the method used for determining the DH as well as the type of enzyme used in the WPC hydrolysis. According to Sampaio [38], r values greater than 0.7 with $p < 0.05$ indicate a strong association between the data.

With regard to pancreatin, a strong positive correlation was observed between the content of medium peptides (F2) and the DH obtained by formaldehyde and OPA. Additionally, a strong negative correlation with the content of large peptides (F1) was found for these two methods. In the case of the *Aspergillus oryzae* protease, only a strong negative correlation was observed between the concentration of large peptides (F1) and the DH for the OPA method. As expected, these results indicate that, in some cases, an increase in the hydrolysis time of WPC proteins produces more small peptides and less large peptides.

Among the fractions where a strong correlation with the DH was detected, F1 was a nutritional value parameter for protein hydrolysates. Therefore, for pancreatin, it can be inferred that formaldehyde and OPA can be used as rapid screening methods for the preparation of nutritional formulas, especially the former method, which showed the highest r value (-0.9736). For the *Aspergillus oryzae* protease, only the OPA method can be used for this purpose.

No report was found in the literature correlating the DH of WPC hydrolysates and the peptide profile.

CONCLUSION

The hydrolytic conditions tested in the current study yielded WPC hydrolysates with varying degrees of hydrolysis; the best results were found using the soluble protein content method. However, the most accentuated differences in the DH and the reaction time were obtained by the formaldehyde method for both enzymes (pancreatin and *Aspergillus oryzae* protease). With regard to the peptide profile, the best results were obtained by the action of pancreatin, and this enzyme produced three hydrolysates (H3, H4 and H5) with similar

peptide profiles. Moreover, in some cases, there was a significant correlation between the degree of hydrolysis and the large peptide content.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank CNPq, CAPES and FAPEMIG for their financial support.

REFERENCES

1. Madureira AR, Pereira CI, Gomes AMP, Pintado ME, Malcata FX (2007) Bovine whey proteins: overview on their main biological properties. *Food Res Int* 40:1197-1211
2. Carrasco CA, Guerra M (2010) Lactosuero como fuente de péptidos bioactivos. *An Venez Nutr* 23:42-49
3. Benítez R, Ibarz A, Pagan J. Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones (2008) *Acta Bioquím Clín Latinoam* 42:227-236
4. Cheison SC, Zhang SB, Wang Z, Xu SY (2009) Comparison of a modified spectrophotometric and the pH-stat methods for determination of the degree of hydrolysis of whey proteins hydrolysed in a tangential-flow filter membrane reactor. *Food Res Int* 42:91-97
5. Nielsen PD, Petersen D, Dambmann C (2001) Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *J Food Sci* 66:642-646
6. Spellman D, McEvoy E, O'Cuinn G, Fitzgerald RJ (2003) Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: comparasion of the TNBS, OPA e pH-stat method for quantification of degree of hydrolysis. *Int Dairy J* 13:447-453

7. Silvestre MPC (1997). Review of methods for the analysis of protein hydrolysates. *Food Chem* 60:263-271
8. Silvestre MPC, Hamon M, Yvon M (1994) Analyses of protein hydrolysates. 1. Use of poly (2-hydroxyethyl-aspartamide)-silica column in size-exclusion chromatography for the fractionation of casein hydrolysates. *J Agric Food Chem* 42:2778-2782
9. Silvestre MPC, Hamon M, Yvon M (1994) Analyses of protein hydrolysates. 2. Characterization of casein hydrolysates by a rapid peptide quantification method. *J Agric Food Chem* 42:2783-2789
AOAC (1995) *Official Methods of Analysis*, 16th edn. Association of Official Analytical Chemists, Arlington
10. Church FC, Swaisgood HE, Porter DH, Catignani GH (1983) Spectrophotometric assay using o-phthalaldehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *J Dairy Sci* 66:1219-1227
11. Adler-Nissen J (1986) *Enzymic hydrolysis of food proteins*. Elsevier Applied Science Publishers, New York
12. Hoyle NT, Merritt JH (1994) Quality of fish protein hydrolysates from herring (*Clupea harengus*). *J Food Sci* 59:76-79.
13. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.
14. Hartree EF (1972) Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal Biochem* 48:422-427.
15. Ferreira DF (2010) SISVAR version 5.3 (build 75). DEX/UFLA, Lavras
16. Pimentel-Gomes, F (2000) *Curso de estatística experimental*. 14th edn. Nobel, Piracicaba

17. Ayres M, Ayres Jr M, Ayres DL, Santos AAS (2007) BioEstat: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Sociedade Civil Mamirauá: MCT-CNPq, Belém. <http://www.mamiraua.org.br/downloads/programas>. Accessed 15 Mar 2012
18. Carreira RL, Ornellas CBD, Morais HA, Da Motta S, Silvestre MPC (2003) Efeito da precipitação pelo ácido tricloroacético (TCA) e da ultrafiltração sobre o perfil peptídico de hidrolisados de caseína. *Cienc Agrotec* 27:414-421
19. Zaia DAM, Zaia CTBV, Lichti J (1998) Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. *Quím Nova* 21:787-793
20. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (2010) Enzyme Nomenclature: recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the nomenclature and classification of enzymes by the reactions they catalyse. School of Biological and Chemical Sciences, Queen Mary University, Londres. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme>. Accessed 20 Feb 2012
21. Gupta R, Beg QK, Lorenz P (2002) Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 59:15-32
22. Hinsberger A, Sandhu BK (2004) Digestion and absorption. *Curr Paediatrics*; 14:605-611
23. Page MJ, Di Cera E (2008) Serine peptidases: classification, structure and function. *Cell Mol Life Sci* 65:1220-1236
24. Levy M (1935) Equilibria of the basic amino acids in the formol titration. *J Biol Chem* 109:365-381
25. Taylor SH (1957) Formol titration: an evaluation of its various modifications. *Analyst* 82:488-498

26. Pacheco MTB, Sgarbieri VC (2005) Effect of different hydrolysates of whey protein on hepatic glutathione content in mice. *J Med Food* 8:337-342
27. Smyth M, FitzGerald RJ (1998) Relationship between some characteristics of WPC hydrolysates and the enzyme complement in commercially available proteinase preparations. *Int Dairy J* 8:819-827
28. Roth M (1971) Fluorescence reaction for amino acids. *Anal Chem* 43:880-882
29. Wong TM, Boyce COL (1988) In: Cherry JP, Barford RA (ed) *Methods for protein analysis*. American Oil Chemists Society, Champaign
30. Rutherford SM (2010) Methodology for determining degree of hydrolysis of proteins in hydrolysates: a review. *J AOAC Int* 93:1515-1522
31. Rawlings ND, Barrett AJ, Bateman A (2010) MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* 38:D227-D233
32. Doucet D, Otter DE, Gauthier SF, Foegeding EA (2003) Enzyme-induced gelation of extensively hydrolyzed whey proteins by Alcalase: peptide identification and determination of enzyme specificity. *J Agric Food Chem* 51:6300-6308
33. Briczinski EP, Roberts RF (2002) Production of an exopolysaccharide-containing whey protein concentrate by fermentation of whey. *J Dairy Sci* 85:3189-3197
34. Denis A, Brambati N, Dessauvages B, Guedj S, Ridoux C, Meffre N, Autier C (2008) Molecular weight determination of hydrolyzed collagen. *Food Hydroc* 22:989-994
35. Margot A, Flaschel E, Renken A (1994) Continuous monitoring of enzymatic whey protein hydrolysis. correlation of base consumption with soluble nitrogen content. *Process Biochem* 29:257-262
36. Otte J, Ju ZY, Skriver A, Qvist KB (1996) Effect of limited proteolysis on the microstructure of heat-induced whey proteins. *Int. Dairy J* 79:782-790

37. Sampaio IBM (2002) Estatística aplicada à experimentação animal. 2nd edn. FEPMVZ, Belo Horizonte
38. Morais HA, De Marco LM, Oliveira MC, Silvestre MPC (2005) Casein hydrolysates using papain: peptide profile and encapsulation in liposomes. *Acta Alimentaria* 34:59-69
39. Soares RDL, Capobianco MB, Rolim EA, Silvestre MPC (2007) Enzyme-catalyzed production of oligopeptides from skim milk. *Food Biotech* 21:45-56
40. Silva VDM, Marco LM, Afonso WO, Lopes DCF, Januário JN, Aguiar MJB, Starling ALP, Silvestre MPC (2007) Preparation of low-phenylalanine whey hydrolysates using papain and pancreatin immobilized on activated carbon and alumina. *Am J Food Technol* 2:327-341
41. Souza MWS, Biasutti EAR, Carreira RL, Afonso WO, Silva VDM, Silvestre MPC (2008) Obtaining oligopeptides from whey: use of subtilisin and pancreatin. *Am J Food Technol* 3:315-324
42. Lopes DCF, Bizzotto CS, Carreira RL, Afonso WO, Lopes Jr CO, Silvestre MPC (2008) Removal of phenylalanine from protein hydrolysates prepared with rice. *J Food Technol* 6:57-65
43. Carreira RL, Silva VDM, Lima LG, Morais HA, Silvestre MPC (2011) Perfil peptídico de hidrolisados proteicos da farinha de trigo. *Pesq Agropec Trop* 41:481-489
44. Gilbert ER, Wong EA, Webb Jr KE (2008) Peptide absorption and utilization: implications for animal nutrition and health. *J Animal Sci* 86:1493-1501
45. Frenhani PB, Burini RC (1999) Mecanismos de absorção de aminoácidos e oligopeptídeos: controle e implicações na dietoterapia humana. *Arq Gastroent* 36:227-237.

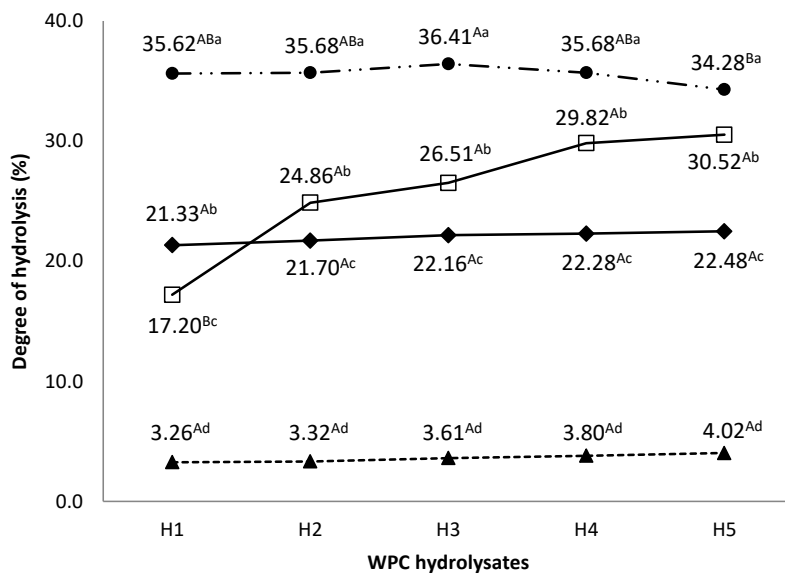


Figure 1 – Degree of hydrolysis of WPC hydrolysates obtained by the action of a pancreatin. Methods of formol titration (□), derivatization with orthophthalaldehyde (◆), osmometry (▲) and soluble protein content (●). The results represent the means of triplicate experiments. Different capital letters represent significantly different ($p < 0.05$) values for a same method and different hydrolysates. Small letters represent significantly different ($p < 0.05$) values for a same hydrolysate and different methods.

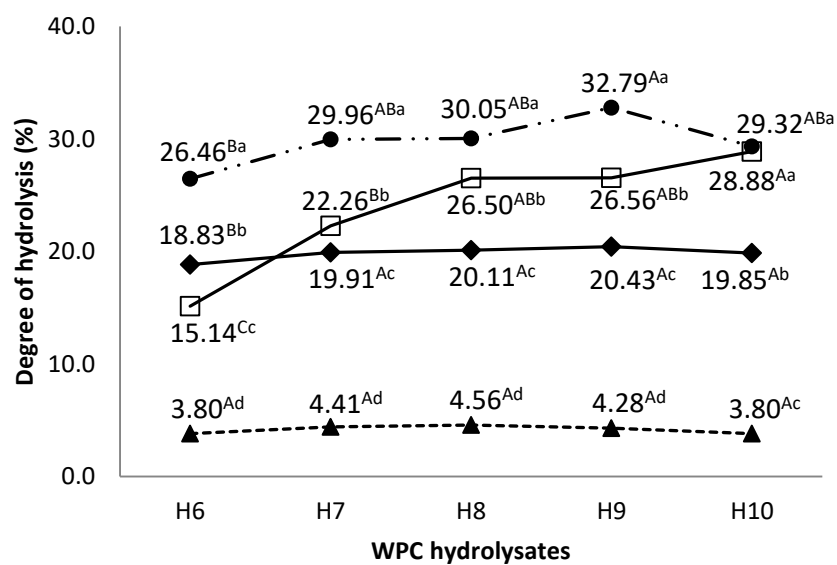


Figure 2 – Degree of hydrolysis of WPC hydrolysates obtained by the action of *Aspergillus oryzae* protease. Methods of formol titration (□), derivatization with orthophtalaldehyde (◆), osmometry (▲) and soluble protein content (●). The results represent the means of triplicate experiments. Different capital letters represent significantly different ($p < 0.05$) values for the same method and different hydrolysates. Small letters represent significantly different ($p < 0.05$) values for the same hydrolysate and different methods.

TABLE 1.
CORRELATION AMONG THE METHODS FOR THE EVALUATION OF THE DEGREE
OF HYDROLYSIS

Comparisons	Pancreatin		<i>Aspergillus oryzae protease</i>	
	r^a	p^b	r^a	p^b
Formaldehyde with OPA ^c	0.9616	0.0090	0.8461	0.0707
Formaldehyde with Osmometry	0.8784	0.0493	0.3022	0.6211
Formaldehyde with Soluble Protein	-0.3337	0.5831	0.7180	0.1719
OPA ^c with Osmometry	0.9515	0.0127	0.6582	0.2271
OPA ^c with Soluble Protein	-0.3552	0.5575	0.9596	0.0097
Osmometry with Soluble Protein	-0.5659	0.3199	0.5921	0.2927

^ar: correlation; ^bp: determined by t-Student test with significant differences for $p < 0.05$;

^cOPA: ortophtalaldehyde.

TABLE 2.
PEPTIDE AND FREE AMINO ACID CONTENT IN CHROMATOGRAPHIC
FRACTIONS OF WPC HYDROLYSATES

Hydrolysates	Reaction time (hours)	F1 ^a	F2 ^b	F3 ^c	F4 ^d
<i>Pancreatin</i>					
H1	1	56.69 ± 1.94 ^C	35.63 ± 2.03 ^B	4.22 ± 0.23 ^D	3.46 ± 0.34 ^D
H2	2	45.54 ± 0.58 ^D	42.02 ± 0.63 ^A	6.43 ± 0.70 ^B	6.01 ± 0.84 ^B
H3	3	42.43 ± 2.82 ^{DE}	44.65 ± 2.00 ^A	9.07 ± 0.70 ^A	3.85 ± 0.15 ^{CD}
H4	4	41.33 ± 4.83 ^E	43.57 ± 4.79 ^A	7.12 ± 0.73 ^B	7.98 ± 0.63 ^A
H5	5	41.13 ± 2.56 ^E	44.18 ± 3.41 ^A	6.46 ± 0.15 ^B	8.22 ± 1.08 ^A
<i>Aspergillus oryzae</i> protease					
H6	1	81.35 ± 1.42 ^A	14.57 ± 1.65 ^E	0.21 ± 0.02 ^F	3.87 ± 0.28 ^{CD}
H7	2	70.55 ± 1.27 ^B	23.40 ± 1.93 ^C	2.79 ± 0.45 ^E	3.26 ± 0.51 ^D
H8	3	72.10 ± 0.41 ^B	20.52 ± 0.74 ^{CD}	3.14 ± 0.11 ^E	4.23 ± 0.42 ^{CD}
H9	4	72.23 ± 1.75 ^B	21.10 ± 1.15 ^C	2.62 ± 0.10 ^E	4.05 ± 0.57 ^{CD}
H10	5	72.73 ± 1.46 ^B	16.74 ± 2.03 ^{DE}	5.66 ± 0.42 ^C	4.87 ± 0.49 ^C

Values are in % of nmol of the four fractions and represent the means of triplicate. Different numbers represent significantly different ($p < 0.05$) values for different fractions of the same hydrolysate. ^aF1: large peptides (> 7 amino acid residues); ^bF2: medium peptides (4 to 7 amino acid residues); ^cF3: di- and tripeptides; ^dF4: free amino acids. Different letters (A, B, C...) represent significantly different ($p < 0.05$) values for the same fraction of different hydrolysates.

TABLE 3.
CORRELATION BETWEEN THE DEGREE OF HYDROLYSIS AND THE PEPTIDE
PROFILES OF WPC HYDROLYSATES.

Degree of hydrolysis (method)	Chromatographic fractions	Pancreatin		<i>Aspergillus oryzae</i> protease	
		r ^a	p ^b	r ^a	p ^b
Formaldehyde	F1 ^d	-0,9736	0,0051	-0.7992	0.1046
	F2 ^e	0,9274	0,0232	0.3876	0.5191
	F3 ^f	0,6428	0,2420	0.8879	0.6376
	F4 ^g	0,8145	0,0931	0.5887	0.2993
OPA ^c	F1	-0,9273	0,0233	-0.8941	0.0407
	F2	0,8977	0,0386	0.7527	0.1419
	F3	0,6529	0,2274	0.5660	0.3199
	F4	0,7161	0,1736	0.1310	0.8337
Osmometry	F1	-0,7808	0,1190	-0.6624	0.2231
	F2	0,7221	0,1683	0.8709	0.0546
	F3	0,4129	0,4896	0.0039	0.9951
	F4	0,7686	0,1288	-0.4337	0.4656
Soluble Protein Content	F1	0,1503	0,8094	-0.7814	0.1185
	F2	-0,0580	0,9261	0.7286	0.1626
	F3	0,4117	0,4910	0.3923	0.5136
	F4	-0,6634	0,2222	0.0248	0.9685

^ar: correlation; ^bp: determined by t-Student test with significant differences for p < 0.05; ^cOPA: ortophtalaldehyde; ^dF1: large peptides (> 7 amino acid residues); ^eF2: medium peptides (4 to 7 amino acid residues); ^fF3: di- and tripeptides; ^gF4: free amino acids.

5.4 Use of different proteases to obtain whey protein concentrate hydrolysates with inhibitory activity toward angiotensin-converting enzyme

Harriman Aley Morais, Marialice Pinto Coelho Silvestre, Josianne Nicácio Silveira, Ana Cristina Simões e Silva, Viviane Dias Medeiros Silva, Mauro Ramalho Silva

M.P.C. Silvestre*

Federal University of Minas Gerais, Av. Pres. Antonio Carlos, 6627, CEP 31270-901. Belo Horizonte, MG, Brazil.

Edetec Food Industry S/A., Av. José Cândido da Silveira, 2100, CEP 31035-536, Belo Horizonte, MG, Brazil. Phone: +55 31 3486 4167. E-mail: malice@ufmg.br

H.A. Morais

Federal University of Minas Gerais, CEP 31270-901. Belo Horizonte, MG, Brazil.

Federal University of Jequitinhonha and Mucuri Valleys, 39100-000, Diamantina, MG, Brazil.

J.N. Silveira, A.C. Simões e Silva

Federal University of Minas Gerais, CEP 31270-901. Belo Horizonte, MG, Brazil.

V.D.M. Silva, M.R. Silva

Edetec Food Industry S/A., Av. José Cândido da Silveira, 2100, CEP 31035-536, Belo Horizonte, MG, Brazil.

ABSTRACT

The effects of enzyme type (including pancreatin and proteases from *Bacillus licheniformis*, *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus sojae*) and enzyme:substrate ratio (E:S = 0.5:100, 1:100, 2:100, 3:100, 4:100 and 8:100) were evaluated in this work with the aim of obtaining whey protein concentrate hydrolysates with inhibitory activity toward angiotensin-converting enzyme. Such hydrolysates could be used in the development of dietary supplements for the non-pharmacological treatment of hypertension. Twenty-four hydrolysates were prepared, and their inhibitory activities (IA) were evaluated in vitro, resulting in inhibition rates ranging from 2.02 to 96.66%. Eleven samples had IAs that were very high (>80%). The hydrolysates obtained using the *B. licheniformis* protease had the highest IA values at all tested E:S ratios. In some cases, lowering the E:S ratio produced a higher IA value. This was observed for the *B. licheniformis* protease when the ratio was lowered from 2:100 to 1:100, as well as for the *A. oryzae* protease when lowered from 3:100 to 2:100 and from 2:100 to 1:100.

Keywords: protein hydrolysates, whey, angiotensin-converting enzyme, inhibitory activity, microbial enzymes, pancreatin.

INTRODUCTION

The prevalence of chronic degenerative disorders, such as cardiovascular and chronic kidney diseases, represents a hindrance to economic and social development and a detriment to the quality of life of millions of people. These diseases are considered the leading causes of premature mortality and morbidity in many countries. In Latin America, it is predicted that, for the next two decades, the mortality caused by ischemic heart disease and stroke will triple (Paho, 2007). In Brazil, the prevalence and incidence rates of chronic kidney disease patients on dialysis were 405 and 144 patients per 1 million population, respectively (Sesso et al., 2010). In addition, arterial hypertension, which is one of the main risk factors for cardiovascular and renal diseases, affects between 8 to 30% of the population in Latin America (Paho, 2007).

The angiotensin-converting enzyme (ACE) plays a crucial role in the regulation of blood pressure by converting angiotensin I into angiotensin II, a potent vasoconstrictor, and by simultaneously inactivating bradykinin, a vasodilator (Simões et al., 2011). Because these regulatory activities of ACE increase blood pressure, synthetic ACE inhibitors are often used in the treatment of arterial hypertension (Erdman, 2008).

Scientific evidence suggests that increasing protein intake, particularly plant protein, can reduce the risk of hypertension and cardiovascular disease (Erdmann et al., 2008), and this effect could be caused by bioactive peptides released from consumed protein. Such peptides are inactive as part of their intact proteins, but they become active when released during digestion or during *in vitro* enzymatic hydrolysis (Hartmann; Meisel, 2007; Möller et al, 2008).

Milk proteins are considered to be the most important source of bioactive peptides, and several studies have reported that hydrolysates and peptides derived from milk proteins exhibit inhibitory activity (IA) against ACE. Milk proteins could thus be introduced into the diet as an alternative, non-pharmacological approach to prevent and treat arterial hypertension (Costa *et al.*, 2007, Jiang *et al.* 2007; Miguel *et al.* 2007; Otte *et al.*, 2007a).

In this context, our group evaluated if other proteins might exhibit ACE-inhibitory activity. We investigated the effects of enzyme type (pancreatin or papain), enzyme:substrate ratio (0.5:100, 1:100, 2:100 or 3:100) and the use of ultrafiltration in producing enzymatic hydrolysates from whey protein concentrate (WPC) (Silva, 2010). Whey is a by-product of cheese production, and the proteins it contains are of high biological value. The inhibitory activity of WPC was only observed after enzymatic treatment, resulting in inhibition rates

ranging from 17.29% to 91.88% (Silva, 2010). Therefore, this study sought to optimize the enzymatic hydrolysis of whey protein concentrate in order to obtain protein hydrolysates with ACE inhibitory activity. Such hydrolysates could be used to prepare dietary supplements for the non-pharmacological treatment of arterial hypertension.

The work presented here represents an important advance in the study of the ACE-inhibitory activity of protein hydrolysates. Aiming the evaluation of this property of WPC enzymatic hydrolysates, we have compared the activities of a large number of enzymes, three of microbial origin and one pancreatin, and we have explored a wide range of E:S ratios (from 0.5:100 to 8:100). This is the first time that such test conditions have been reported in the literature.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Powdered WPC (Kerrylac 750) was kindly provided by Kerry do Brazil Ltda. (Três Corações, MG, Brazil). Pancreatin (Corolase® PP, activity 5.97 U.mL⁻¹) and the proteases from *Aspergillus sojae* (Corolase LAP®, activity 0.63 U.mL⁻¹), *Bacillus subtilis* (Alcalase ®, activity 6.22 U.mL⁻¹) and *Aspergillus oryzae* (Flavourzyme ®, activity 0.69 U.mL⁻¹) were kindly provided by AB Enzymes (Barueri, SP, Brazil). In this paper, one unit of activity is defined as the amount of enzyme that releases 1 µg of tyrosine per minute at 37 °C.

Angiotensin-converting enzyme (E.C. 3.4.15.1, 0.25 U.mg⁻¹), hippuril-histidyl-leucine (HHL) and hippuric acid (HA) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA.). Trifluoroacetic acid and acetic acid, both of HPLC grade, were obtained from Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brazil). Methanol, HPLC grade, was supplied by JT Baker (Phillipsburg, NJ, USA.). The polyvinylidene fluoride membranes used for the filtration of samples (0.22 µm) and solvents (0.45 µm), as well as a tangential flow system with a 10 kDa cut-off membrane, were purchased from Millipore (São Paulo, Brazil). All other reagents used in this study were of analytical grade.

The reverse-phase high-performance liquid chromatography system (RP-HPLC) comprised the following: a GraceSmart RP-18 chromatography column, 150 x 4.6 mm, 5 µm and 120 Å (Grace Davison, Deerfield, IL, USA.); an isocratic pump and a UV-Vis spectrophotometric detector (1200 series, Agilent, Santa Clara, USA.) connected to a computer

with Chem Station software for LC Systems (Agilent, Santa Clara, U.S.A.). The water used to prepare the mobile phase was purified with the MilliQ system (Millipore, Billerica, MA, U.S.A.).

Methods

Preparation of WPC Enzymatic hydrolysates

Twenty-four hydrolysates were prepared by varying the enzyme type and the enzyme:substrate ratio (E:S). The conditions used for preparing these hydrolysates are shown in Table 1, where the values of pH and temperature correspond to the optima provided by the enzyme's manufacturer.

Solutions of whey protein concentrate (10 g%, w/v) were prepared with distilled water; the concentration of protein in each solution was 3.42%, and the pH was adjusted to 7.0 or 8.0 with a 3 mol.L⁻¹ NaOH solution. These solutions were heated in a vaseline bath under continuous stirring by a magnetic stirrer (model 752A, Fisatom, São Paulo, SP, Brazil), followed by the addition of enzymes in sufficient concentration to obtain the desired E:S ratio. The total hydrolysis time was 5 hours. After this period, the reaction was stopped by heating in a water-bath at 75 °C for 15 seconds. The samples were subsequently lyophilized (Freeze Dry System / FreeZone 4.5, model 77500, Labconco, Kansas City, USA) and stored in a freezer (-4 °C) until they were analyzed.

Evaluation of the ACE-inhibitory activity of the protein hydrolysates in vitro

Evaluation of the ACE-inhibitory activity of the WPC hydrolysates was performed according to the method developed by Wu et al. (2002) using RP-HPLC. Initially, a volume of 12.5 µL of the substrate hippuryl-histidyl-leucine (HHL) (2.17 mmol.L⁻¹) was mixed with 50 µL of each hydrolyzed WPC (10 mg mL⁻¹), both of which were prepared with a 100 mM borate buffer, pH 8.3, containing 300 mM NaCl, and the mixture was incubated at 37 °C for 10 min. A volume of 200 µL of ACE (4 mU), prepared in the same buffer, was subjected to a similar treatment. The two solutions were subsequently mixed, and after incubation at 37 °C for 30 min, the reaction was stopped by the addition of 125 µL of HCl (1 mol L⁻¹). Next, the mixture was filtered through a 0.22 µm membrane for analysis by RP-HPLC. Standard

solutions of hippuric acid (HA), in concentrations ranging from 0.05 to 7.25 mmol L⁻¹, were also subjected to a similar treatment to generate a standard curve.

For the analysis of ACE-IA, a GraceSmart RP-18 column was used, and the hippuric acid and HHL were detected at 228 nm. The elution flow rate was 0.5 mL min⁻¹ with a two-solvent system: (A) 0.05% TFA in water and (B) 0.05% TFA in acetonitrile with a 5–60% acetonitrile gradient for the first 10 min, 2 min at 60% acetonitrile and 1 min at 5% acetonitrile. This procedure was followed by isocratic elution for 4 min at a constant flow rate of 0.5 ml min⁻¹.

The ACE inhibitory activity was expressed as a percentage of inhibition and as an IC₅₀ value. IC₅₀ is defined as the concentration of hydrolysate (mg mL⁻¹) necessary to reduce the activity of ACE by 50%.

Evaluation of the effects of parameter changes

The effects of certain parameters (enzyme type and E:S ratio) on the ACE inhibitory activity of WPC hydrolysates were evaluated. Four enzymes (proteases from *Bacillus licheniformis*, *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus sojae*, as well as pancreatin) were used for preparing hydrolysates with E:S ratios of 0.5:100, 1:100, 2:100, 3:100, 4:100 and 8:100.

Statistical analysis

All experiments and measurements were performed in triplicate. A completely randomized factorial design (four enzymes x six E:S ratios) was adopted to test for significant effects among the various treatments ($p < 0.05$). The results were analyzed with Statistica software (STAT SOFT, 2000). An analysis of variance was performed to evaluate the effects of enzyme type and E:S ratio, and the Duncan test was applied to establish differences between means (Pimentel-Gomes, 2000).

RESULTS AND DISCUSSION

Of the twenty-four hydrolysates evaluated (Table 2), eleven exhibited very high ACE-inhibitory activity (ACE-IA) (>80%: H1 to H6, H12, H21 to H24) and five exhibited high activity (>70%: H8 to H11; H20) relative to the range of values reported in the literature (Otte

et al., 2007a,b). Two hydrolysates (H7 and H19) exhibited moderate inhibitory activity (40-60%), and six samples (H13 to H18) exhibited low ability to inhibit ACE (<20%).

It is noteworthy that the greatest ACE-IA results were obtained with the *B. licheniformis* protease (H6: 96.66%), followed by the *A. oryzae* protease (H12: 90.22%), both with the E:S ratio of 8:100. The hydrolysates that exhibited the lowest ACE-IA were those prepared with the *A. sojae* protease.

A very low ACE-IA was found for undigested WPC (1.3%), indicating that enzymatic treatment to release small peptides is required for the manifestation of this bioactivity. In a previous study by our group that used a different methodology, no ACE-IA was found for undigested WPC (Silva, 2010).

A similar phenomenon has already been reported in the literature by some authors. Mullally, Meisel and Fitzgerald (1997) found low values of ACE-IA for α -lactalbumin (3.5%), WPC (7.1%) and β -lactoglobulin (9.6%) before hydrolysis by various proteolytic enzymes. No value was reported by Hernandez-Ledesma et al. (2002) for the ACE-IA of intact β -lactoglobulin from sheep and goat. Jiang et al. (2007) showed that intact yak milk casein showed low ACE-IA (<5%). Guo et al. (2009) showed that, for a zero-degree hydrolysis, no ACE-IA was found for WPC. More recently, Wang et al. (2010) reported an ACE-IA of less than 10% for a whey protein isolate (WPI).

In most cases, ACE-IA has been attributed to low molecular weight peptides, which usually contain 2 to 12 amino acid residues, although peptides with more than 20 amino acid residues have also been identified (Lopez-Fandino, Otte, Camp, 2006). Pihlanto-Leppälä, Rokko and Korhnen (1998) demonstrated that peptides from whey protein with molecular masses less than 1.000 Da (containing 6 to 8 amino acid residues) exhibited the highest ACE inhibitory activities. In another study, Chobert et al. (2005) observed that increasing the hydrolysis time of β -lactoglobulin with trypsin led to an increase of ACE-IA from 85% to 92%. This increase could be due to a reduction in the size of the peptides found in the hydrolysate, although the authors did not make that inference explicitly.

A correlation between the size of peptides and ACE inhibitory activity was also described for β -lactoglobulin digested with trypsin, chymotrypsin, proteinase K and thermolysin (Hernández-Ledesma et al., 2002), as well as for casein after enzymatic hydrolysis with pepsin (Contreras et al., 2009). In both of these studies, the most potent peptides obtained by enzymatic hydrolysis were those smaller than 870 Da, containing 3 to 8 amino acid residues. In a study by Tsai et al. (2008), the inhibitor peptides from whey hydrolysates obtained by using *A. oryzae* protease were separated into four fractions (F1: 530

Artigo aceito para publicação no periódico *Journal of Food Biochemistry*, 2013.

Da; F2: 840 Da; F3: 1.390 Da and F4: 1.530 Da), and the highest percentage of inhibitory activity was obtained in fraction F1, which contained peptides with 3 to 4 amino acid residues.

In contrast, Otte et al. (2007a) analyzed hydrolysates of α -lactalbumin and β -casein produced with two digestive (trypsin and pepsin) and three microbiological proteolytic enzymes (*Tritirachium album*, *Bacillus thermoproteolyticus*, *Bacillus licheniformis*) and reported that the most potent peptides were those with molecular masses around 1.000 Da and 2.000 Da, respectively. This demonstrates that even peptides containing up to twelve amino acid residues can have considerable ACE inhibitory activity.

There are four previous studies of the ACE-IA of WPC hydrolysates that can be found in the literature, of which three were carried out by other authors and one was conducted by our group. Mullally, Meisel and Fitzgerald (1997), using five different proteases (trypsin, chymotrypsin, elastase, PTN3.0S, and a pancreatin similar to that used in this work), obtained hydrolysates with ACE-IA ranging from 35.0% to 88.6%, a range that covers most of the results found in the current study. Ven et al. (2002) used a pancreatin (Corolase® PP), similar to that used in the current work, for the hydrolysis of WPC 60, and several hydrolytic parameters were varied. They noted that the IC₅₀ values of the hydrolysates ranges from 0.17 to 0.88 mg/mL, range that covers most of the values observed in the current study. In contrast, Guo, Pan and Tanokura (2009) used only one enzyme to obtain WPC hydrolysates (a protease from *Lactobacillus helveticus* LB13), and they tested the influence of several hydrolytic parameters. They obtained hydrolysates with ACE-IA changing from 15% to 63%, a range of values that are less than most of the results reported here.

In another study from our group, Silva (2010) carried out the hydrolysis of WPC with a pancreatin similar to that used in the present study. It was found that the ACE-IA changed from 79.28% to 91.88% for E:S ratios of 0.5:100 to 3.0:100, respectively. Despite the higher catalytic activity of the pancreatin used by Silva (2010) (34.7 U.mL⁻¹), when compared to the pancreatin used in the present study (5.97 U.mL⁻¹), the results were close to four of the six hydrolysates prepared here with the same enzyme (H21 to H24) and were superior only to two hydrolysates (H19 and H20).

Effect of parameter changes on ACE inhibitory activity

Changes in enzyme type and enzyme: substrate ratio (E:S) were evaluated for their effects on two different outcomes: the production of hydrolysates with high ACE inhibitory

activity and the reduction of costs for scaling-up the process (i.e., the ability to use low E:S ratios).

Effect of enzyme type

The influence of this parameter on the ACE-inhibitory activity of protein hydrolysates can be seen in Figure 1. Six groups are considered, each corresponding to a particular E:S ratio with other parameters held constant.

Using the protease from *Bacillus licheniformis* appears to be advantageous, because, for all groups, the highest ACE-IA values were obtained by the action of this enzyme. In descending order of the ACE-IA values were the actions of the pancreatin and the *A. oryzae* protease which gave rise to similar results to each other. Pancreatin treatment produced an ACE-IA similar to that of the *B. licheniformis* protease in one group (E:S = 2.0:100), and it was the second best in two groups (E:S = 3.0:100 and 4.0:100) and third best in three groups (E:S = 0.5:100, 1.0:100 and 8.0:100). Treatment with the protease from *A. oryzae* resulted in ACE-IA values that were the second best in four groups (E:S = 0.5:100, 1.0:100, 2.0:100 and 8.0:100) and third best in two groups (E:S = 3.0:100 and 4.0:100). Pancreatin had a slight advantage over the *A. sojae* protease in that it produced an ACE-IA value similar to that of the *B. licheniformis* protease in one group, which was higher than the values obtained using other enzymes. It is also apparent in Figure 1 that the poorest performing enzyme was the *A. sojae* protease, which produced lower ACE-IA values than those obtained with other enzymes in all groups.

These results indicate that choice of enzyme for protein hydrolysis can affect the ACE inhibitory activity of the hydrolysates because the structure of the peptides released by enzymatic treatment influences this property. It is known that the most potent inhibitors are peptides containing aromatic (tryptophan, tyrosine, phenylalanine), hydrophobic (proline) or basic (lysine or arginine) amino acids in the C-terminal position (Lopez-Fandino, Otte, Camp, 2006; Ferreira et al., 2007), and it is also known that the presence of a glutamic acid residue in this position can reduce the inhibitory activity of these peptides (Otte et al., 2007b). In the N-terminal position, it is desirable to have a dicarboxylic or branched amino acid, such as valine or isoleucine (Li et al. 2004; Costa et al., 2007).

The results obtained for the *B. licheniformis* protease were expected, in light of these known amino acid preferences, because the *B. licheniformis* protease is an endopeptidase that preferentially cleaves peptide bonds involving hydrophobic amino acids (Gupta, Beg, Lorenz, Artigo aceito para publicação no periódico *Journal of Food Biochemistry*, 2013).

2002; Doucet et al., 2003), which will then appear at the C-terminal position of resultant peptides.

Pancreatin would be expected to produce similar results to those of the *B. licheniformis* protease, i.e., greater than 80% ACE-IA. However, this was not observed for two hydrolysates (H19 and H20), which led to a reduction of the mean values for pancreatin presented in Figure 1. In fact, the pancreatin used consists of an enzymatic mixture that contains either trypsin, which preferentially cleaves peptide bonds near arginine and lysine residues, or chymotrypsin, which hydrolyzes peptide bonds next to aromatic amino acids (phenylalanine, tyrosine and tryptophan) (Hinsberger & Sandhu, 2004; Page & Di Cera, 2008), which should produce potent ACE peptide inhibitors. It should be noted, however, that the *B. licheniformis* protease showed an enzymatic activity slightly greater than that of the pancreatin (6.22 and 5.97 U.mL⁻¹, respectively), which could explain, at least in part, the results observed here. Moreover, according to Mullally et al. (1997), the pancreatin may contain elastase, which cleaves peptide bonds near non-aromatic and uncharged amino acids that have low ACE-IA.

The results obtained for the *A. oryzae* protease can likely be explained by the fact that this enzymatic mixture should be composed of different enzymes, which may individually favor or hinder the release of peptides with ACE-IA. According to the Merops database (Rawlings, Barrett, Bateman, 2010), there are 126 types of proteases/peptidases that can be produced by this type of fungus. In addition, the lower ACE-IA values found for the *A. oryzae* protease, compared to the *B. licheniformis* protease and pancreatin, may most likely be attributable to its lower enzymatic activity (0.69 U.mL⁻¹ versus 5.97 U.mL⁻¹ and 6.22 U.mL⁻¹, respectively).

The worst performing enzyme was the *A. sojae* protease, and this result can be explained by the fact that it is an exopeptidase (NC-IUBMB, 2010) that produces free amino acids that have low ACE-IA. Although no work in the literature affirms that free amino acids do not have this inhibitory action, according to López-Fandino, Otte and Camp (2006), the peptides that inhibit ACE usually contain from 2 to 12 amino acid residues. Moreover, this enzyme had the lowest activity (0.63 U.mL⁻¹) among all the enzymes used in the current study.

Only two studies addressing the effect of enzyme type on the ACE inhibitory activity of WPC hydrolysates, one of which is a previous study from our group, were found in the literature. In the study from our group, the same pancreatin used in the current study and a papain were used to hydrolyze WPC, and it was observed that the highest ACE-IA values

were obtained for hydrolysates produced with the pancreatin (84.16% and 58.76%, respectively) (Silva, 2010). The better performance of the pancreatin was attributed to its chymotrypsin activity, which hydrolyzes peptide bonds near aromatic amino acids and releases peptides with high ACE-IA. In contrast, the papain produced less powerful peptides because it is an endopeptidase that cleaves peptide bonds near lysine, arginine and valine.

The study by Mullally, Meisel and Fitzgerald (1997) evaluated the effects of four enzymes and showed that the most efficient ones were trypsin (88.6%) and chymotrypsin (87.7%), followed by pancreatin (60.8%) and finally, elastase (35.5%). According to these authors, the lower ACE-IA values obtained for the elastase are related to the fact that it hydrolyzes peptide bonds near non-aromatic and non-charged amino acids, producing peptides with low ACE-IA. Moreover, these authors stated that the lower results obtained using pancreatin, compared to trypsin and chymotrypsin, may also be explained by the fact that this enzymatic mixture has elastase activity.

Effect of the enzyme:substrate ratio

Figure 2 shows the influence of E:S ratio (0.5:100, 1.0:100, 2.0:100, 3.0:100, 4.0:100 and 8.0:100) on the ACE-IA of WPC enzymatic hydrolysates. Data are presented in four groups, each corresponding to a specific enzyme with other parameters held constant.

As shown in Figure 2, there is a general tendency toward greater ACE-IA with increasing E:S ratio, and the best result was found with an E:S ratio of 8.0:100 for the four tested enzymes. However, in some cases, as observed for two of the four enzymes, it was possible to achieve higher ACE-IA by using a lower E:S, which would correspond to lower costs for industrial scale-up of the process. The action of the *B. licheniformis* protease produced a greater ACE-IA value when reduced from 2.0:100 to 1.0:100, and the same occurred for the *A. oryzae* protease when reduced from 3.0:100 to 2.0:100 and from 2.0:100 to 1.0:100.

Only two papers addressing the effect of E:S ratio on the ACE-IA of WPC hydrolysates were found in the literature; none of them explored such wide range of E:S ratios. In a previous study by our group, it was shown that with a pancreatin, the ACE-IA increased sharply when changing from an E:S ratio of 1.0:100 to 0.5:100. Using a papain, a significant increase in ACE-IA was observed when E:S was decreased from 3.0:100 to 2.0:100 (Silva, 2010).

In another study, the beneficial effect of using a lower E:S ratio was not observed: Guo, Pan and Tanokura (2009) used a *Lactobacillus helveticus* protease for hydrolyzing WPC and found that decreasing the E:S ratio from 1.2:100 to 0.2:100 did not produce significant changes in the ACE-IA values, which were 63% and 59%, respectively.

The fact that, in some cases, the use of a lower E:S ratio allows for the preparation of hydrolysates with greater ACE-IA could indicate that there is an optimal enzyme concentration, beyond which there is greater degradation than formation of ACE-inhibitor peptides, which would reduce overall inhibitory activity (Raghavan, Kristinsson, 2009).

CONCLUSION

Changes of enzyme type and E:S ratio had different influences on the ability of WPC hydrolysates to inhibit ACE. The *B. licheniformis* protease performed better than other enzymes, and it produced hydrolysates with the greatest rates of ACE inhibition. The best result was obtained using an E:S ratio of 8.0:100. The beneficial effect of using lower E:S ratios to obtain greater values of ACE inhibitory activity was observed for the proteases from *B. licheniformis* and *A. oryzae*.

REFERENCES

CHOBERT, J. M.; EL-ZAHAR, K.; SITOHY, M.; DALGALARRONDO, M.; MÉTRO, F.; CHOISSET, Y.; HAERTLÉ, T. Angiotensin I-converting-enzyme (ACE)-inhibitory activity of tryptic peptides of ovine β -lactoglobulin and of milk yoghurts obtained by using different starters. *Lait*, v. 85, n. 3, p. 141–152, 2005.

CONTRERAS, M. M.; HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; AMIGO, B.; MARTÍN-ÁLVAREZ, P. J.; RECIO, I. Production of antioxidant hydrolyzates from a whey protein concentrate with thermolysin: Optimization by response surface methodology. *LWT - Food Science and Technology*, v. 44, p. 9-15, 2011.

COSTA, E. L.; GONTIJO, J. A. R.; NETTO, F. M. Effect of heat and enzymatic treatment on the antihypertensive activity of whey protein hydrolysates. *International Dairy Journal*, v. 17, p. 632–640, 2007.

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

DIDELOT, S.; BORDENAVE-JUCHEREAU, S.; ROSENFELD, E.; FRUITIER-ARNAUDIN, I.; PIOT, J. M.; SANNIER, F. Preparation of angiotensin-I-converting enzyme

inhibitory hydrolysates from unsupplemented caprine whey fermentation by various cheese microflora. *International Dairy Journal*, v. 16, p. 976–983, 2006.

DOUCET, D.; OTTER, D. E.; GAUTHIER, S. F.; FOEGEDING, E. A. Enzyme-induced gelation of extensively hydrolyzed whey proteins by alcalase: peptide identification and determination of enzyme specificity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, p. 6300-6308, 2003.

ERDMANN, K.; CHEUNG, B. W. Y.; SCHRODER, H. The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 19, n. 10, p. 643-654, 2008.

FERREIRA, I .M. P. L. V. O.; PINHO, O.; MOTA, M. V.; TAVARES, P.; PEREIRA, A.; GONÇALVES, M. P.; TORRES, D.; C. ROCHA, C.; TEIXEIRA, J. A. Preparation of ingredients containing an ACE-inhibitory peptide by tryptic hydrolysis of whey protein concentrates. *International Dairy Journal*, v. 17, p. 481-487, 2007.

GUO, Y.; PAN, D.; TANOKURA, M. Optimisation of hydrolysis conditions for the production of the angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from whey protein using response surface methodology. *Food Chemistry*, v. 114, p. 328-333, 2009.

GUPTA, R.; BEG, Q. K.; LORENZ, P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 59, n. 1, p. 15-32, 2002.

HARTMANN, R.; MEISEL, H. Food-derived peptides with biological activity: from research to food application. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 18, p. 163–169, 2007.

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; RECIO, I.; RAMOS, M.; AMIGO, L. Preparation of ovine and caprine b-lactoglobulin hydrolysates with ACE-inhibitory activity. Identification of active peptides from caprine b-lactoglobulin hydrolysed with thermolysin. *International Dairy Journal*, v. 12, p. 805–812, 2002.

HINSBERGER, A.; SANDHU, B. K. Digestion and absorption. *Current Paediatrics*, v. 14, p. 605-611, 2004.

JIANG, J.; CHEN, S.; REN, F.; ZENG, S. S. Yak milk casein as a functional ingredient: preparation and identification of angiotensin-i-converting enzyme inhibitory peptides. *Journal of Dairy Research*, v. 74, p. 18-25, 2007.

LI, G.-H.; LE, G.-W.; SHI, Y.-H.; SHRESTHA, S. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmacological effects. *Nutrition Research*, v. 24, p. 469–486, 2004.

LOPEZ-FANDINO, R.; OTTE, J.; VAN CAMP, J. Physiological, chemical and technological aspects of milk-protein-derived peptides with antihypertensive and ACE-inhibitory activity. *International Dairy Journal*, v. 16, p. 1277–1293, 2006.

MIGUEL, M.; LOPEZ-FANDINO, R.; ALONSO, M. J.; SALAICES, M. Vascular effects and antihypertensive properties of k-casein macropeptide. *International Dairy Journal*, v. 17, p. 1473-1477, 2007.

MÖLLER, N. P.; SCHOLZ-AHRENS, K. E.; ROOS, N.; SCHREZENMEIR, J. Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. *European Journal of Nutrition*, v. 47, p. 171–182, 2008.

MULLALLY, M. M.; MEISEL, H.; FITZGERALD, R. J. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activities of gastric and pancreatic proteinase digests of whey proteins. *International Dairy Journal*, v. 7, p 299-303, 1997.

NC-IUBMB (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology). Enzyme nomenclature: recommendations of the NC-IUBMB on the nomenclature and classification of enzymes by the reactions they catalyse. Disponível em: <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>>. Acesso em 03 out. 2011.

OTTE, J.; SHALABY, S. M. A.; ZAKORA, M.; NIELSEN, M.S. Fractionation and identification of ACE-inhibitory peptides from α -lactalbumin and β -casein produced by thermolysin-catalysed hydrolysis. *International Dairy Journal*, v. 17, 1460-1472, 2007a.

OTTE, J.; SHALABY, S. M. A.; ZAKORA, M.; PRIPP, A. H.; El-SHABRAWY, S. A. Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of milk protein hydrolysates: Effect of substrate, enzyme and time of hydrolysis. *International Dairy Journal*, v. 17, p. 488–503, 2007b.

PAGE, M. J.; DI CERA, E. Serine peptidases: classification, structure and function. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 65, p. 1220-1236, 2008.

PAHO (Pan American Health Organization). Regional strategy and plan of action on an integrated approach to the prevention and control of chronic diseases, including diet, physical activity ad health. Washington: PAHO, 2007.

PIHLANTO-LEPPÄLÄ, A.; ROKKA, T.; KORHONEN, H. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine milk proteins. *International Dairy Journal*, v. 8, p. 325-331, 1998.

PIMENTEL-GOMES, F. Curso de estatística experimental. 14. ed. Piracicaba: Livraria Nobel, 2000. 477 p.

RAGHAVAN, S.; KRISTINSSON, H.G. ACE-inhibitory activity of tilapia protein hydrolysates. *Food Chemistry*, v. 117, p. 582-588, 2009.

RAWLINGS, N.D.; BARRETT, A. J.; BATEMAN, A. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Research*, v. 38, p. 227-233, 2010.

SESSO, R.C.C.; LOPES, A.A.; THOMÉ FS, LUGON JR, BURDMANN EA. Censo Brasileiro de Diálise, 2009. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, v.4, p. 380-384, 2010.

SIMÕES E SILVA, A.C.; FLYNN, J.T. The renin–angiotensin–aldosterone system in 2011: role in hypertension and chronic kidney disease. *Pediatric Nephrology*, v. 26, p. 1-11, 2011.

SILVA, M. R. Obtenção de hidrolisados enzimáticos do concentrado proteico de soro de leite com alto teor de oligopeptídeos e elevada atividade inibitória sobre a enzima conversora de angiotensina, utilizando a pancreatina e a papaína. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia/Universidade Federal de Minas Gerais, 2010. (Dissertação de Mestrado).

STATSOFT. Statistica for Windows [Computer program manual]. Tulsa, OK: StatSoft, Inc., 2000.

TSAI, J. F.; CHEN, T. J.; PAN, B. S.; GONG, S. D.; CHUNG, M. Y. Antihypertensive effect of bioactive peptides produced by protease-facilitated lactic acid fermentation of milk. *Food Chemistry*, v. 106, p. 552-558, 2008.

VEN, C.; GRUPPEN, H.; BONT, D. B. A.; VORAGEN, A. G. J. Optimization of the angiotensin converting enzyme inhibition by whey protein hydrolysates using response surface methodology. *International Dairy Journal*, v. 12, n. 10, p. 813-820, 2002.

WANG, L.; MAO, X.; CHENGE, X.; XIONG, X.; REN, F. Effect of enzyme type and hydrolysis conditions on the in vitro angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity and as content of hydrolysed whey protein isolate. *International Journal of Food Science & Technology*, v. 45, p. 807-812, 2010.

WU, J.; ALUKO, R.E.; MUIR, A.D. Improved method for direct high-performance liquid chromatography assay of angiotensin-I-converting enzyme-catalyzed reactions. *Journal of Chromatography A*, v. 950, p. 125-130, 2002.

YU, Y.; HU, J.; BAI, X.; DU, Y.; LIN, B. Preparation and function of oligopeptide-enriched hydrolysate from globin by pepsin. *Process Biochemistry*, v. 41, p. 1589–1593, 2006.

Table 1: Parameters used in the preparation of WPC hydrolysates

Hydrolysates	Enzyme Type	E:S	pH	Temperature (°C)
H1 H2 H3 H4 H5 H6	Protease from <i>Bacillus licheniformis</i>	0.5:100 1.0:100 2.0:100 3.0:100 4.0:100 8.0:100	8.0	60 °C
H7 H8 H9 H10 H11 H12	Protease from <i>Aspergillus oryzae</i>	0.5:100 1.0:100 2.0:100 3.0:100 4.0:100 8.0:100	7.0	50 °C
H13 H14 H15 H16 H17 H18	Protease from <i>Aspergillus sojae</i>	0.5:100 1.0:100 2.0:100 3.0:100 4.0:100 8.0:100	7.0	50 °C
H19 H20 H21 H22 H23 H24	Pancreatin	0.5:100 1.0:100 2.0:100 3.0:100 4.0:100 8.0:100	7.0	50 °C

E:S = enzyme:substrate ratio

Table 2: ACE Inhibitory Activity of WPC hydrolysates

Hydrolysates	ACE inhibition (%)	IC ₅₀ (mg/mL)
H1	82.66 ± 0.74 ^{cde}	0.78 ± 0.007 ^e
H2	83.69 ± 0.21 ^c	0.77 ± 0.002 ^e
H3	80.16 ± 0.93 ^{ef}	0.80 ± 0.009 ^e
H4	83.11 ± 0.69 ^{cd}	0.78 ± 0.006 ^e
H5	89.47 ± 0.45 ^b	0.72 ± 0.004 ^e
H6	96.66 ± 0.27 ^a	0.67 ± 0.002 ^e
H7	68.84 ± 0.57 ⁱ	0.94 ± 0.008 ^e
H8	76.54 ± 0.19 ^{gh}	0.84 ± 0.002 ^e
H9	74.64 ± 0.40 ^h	0.86 ± 0.005 ^e
H10	70.28 ± 0.70 ⁱ	0.92 ± 0.009 ^e
H11	78.20 ± 0.06 ^{fg}	0.83 ± 0.001 ^e
H12	90.22 ± 0.65 ^b	0.72 ± 0.005 ^e
H13	2.32 ± 0.20 ^l	27.97 ± 2.398 ^b
H14	2.65 ± 0.24 ^l	24.48 ± 2.070 ^c
H15	2.02 ± 0.20 ^l	32.22 ± 3.263 ^a
H16	2.34 ± 0.07 ^l	27.58 ± 0.842 ^b
H17	2.43 ± 0.18 ^l	26.63 ± 2.098 ^b
H18	14.22 ± 0.26 ^k	4.40 ± 0.083 ^d
H19	63.23 ± 0.04 ^j	1.02 ± 0.001 ^e
H20	75.65 ± 0.27 ^{gh}	0.85 ± 0.003 ^e
H21	80.29 ± 0.76 ^{cde}	0.80 ± 0.008 ^e
H22	80.03 ± 1.04 ^{ef}	0.81 ± 0.010 ^e
H23	82.41 ± 0.38 ^{cde}	0.78 ± 0.004 ^e
H24	88.98 ± 0.72 ^b	0.73 ± 0.006 ^e

WPC = *whey protein concentrate*; IC₅₀ = concentration of hydrolysates (mg.mL⁻¹) required to inhibit 50% of enzymatic activity ACE = angiotensin-converting enzyme. Results are expressed as mean ± standard deviation. Different letters represent significantly different values ($p < 0.05$) for different hydrolysates.

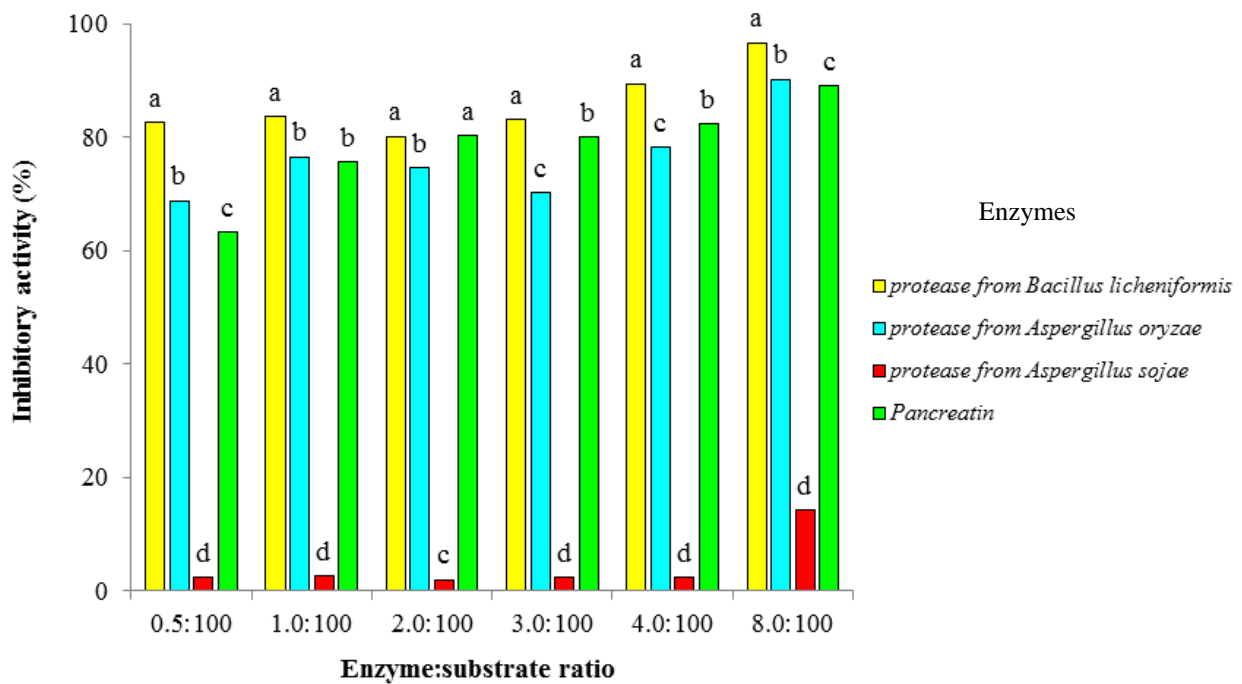


Figure 1 - Effect of enzyme type on ACE inhibitory activity of whey protein concentrate

hydrolysates. Each value represents the mean of triplicate measurements. Different letters represent significantly different ($p < 0.05$) values for the same E:S ratio using different enzymes.

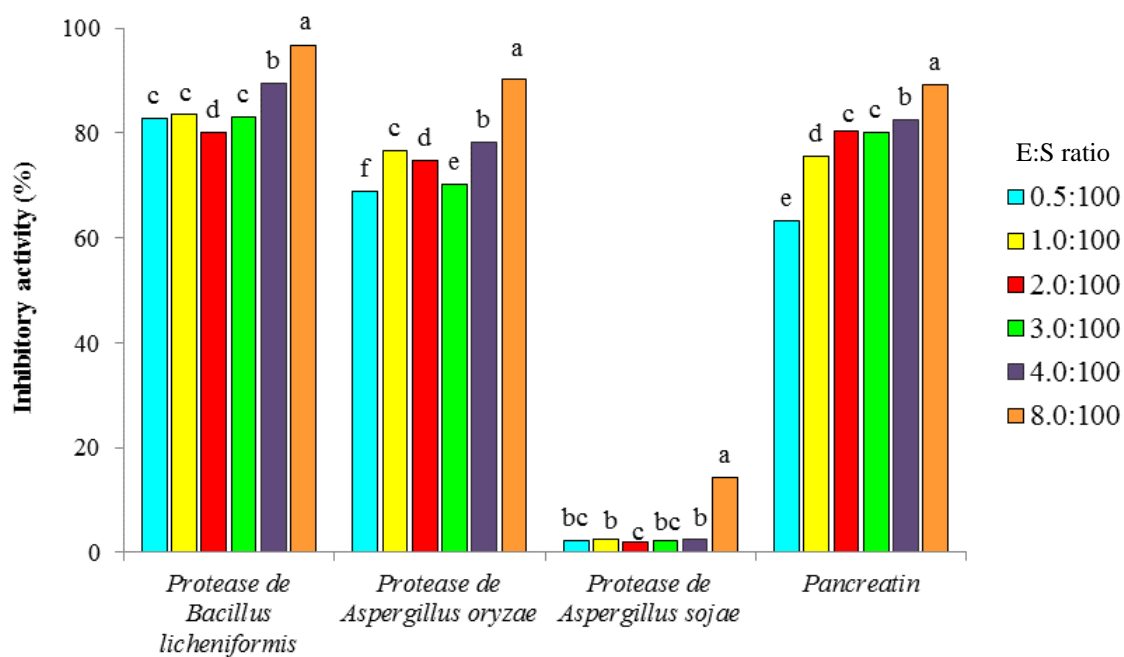


Figure 2 – Effect of the enzyme:substrate ratio (E:S) on the ACE inhibitory activity of whey protein concentrate hydrolysates. Each value represents the mean of triplicate measurements. Different letters represent significantly different ($p < 0.05$) values for the same enzyme at different E:S ratios.

5.5 Evaluation of the antioxidant activity of hydrolysates from whey protein concentrate: effects of the enzyme type and enzyme: substrate ratio

Harriman Aley Morais, Marialice Pinto Coelho Silvestre, Josianne Nicácio Silveira, Ana Cristina Simões e Silva, Viviane Dias Medeiros Silva, Mauro Ramalho Silva

M.P.C. Silvestre*

Federal University of Minas Gerais, Av. Pres. Antonio Carlos, 6627, CEP 31270-901. Belo Horizonte, MG, Brazil.

Edetec Food Industry S/A., Av. José Cândido da Silveira, 2100, CEP 31035-536, Belo Horizonte, MG, Brazil. Phone: +55 31

3486 4167. E-mail: malice@ufmg.br

H.A. Morais

Federal University of Minas Gerais, CEP 31270-901. Belo Horizonte, MG, Brazil.

Federal University of Jequitinhonha and Mucuri Valleys, 39100-000, Diamantina, MG, Brazil.

J.N. Silveira, A.C. Simões e Silva

Federal University of Minas Gerais, CEP 31270-901. Belo Horizonte, MG, Brazil.

V.D.M. Silva, M.R. Silva

Edetec Food Industry S/A., Av. José Cândido da Silveira, 2100, CEP 31035-536, Belo Horizonte, MG, Brazil.

ABSTRACT

The enzymatic hydrolysis of whey proteins enables the production of bioactive peptides, creating an alternative to the use of this dairy by-product. In the present work, the in vitro antioxidant activity of 24 enzymatic hydrolysates from whey protein concentrate (WPC) was evaluated. These hydrolysates were obtained by the action of different enzymes (pancreatin and proteases from *Bacillus licheniformis*, *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus sojae*) at the enzyme: substrate ratios (E:S) of 0.5:100, 1:100, 2:100, 3:100, 4:100 and 8:100. It was observed a large variability of the results obtained for the antioxidant activity, ranging from 3.79% to 90.76%. The hydrolysates obtained by the action of the *A. sojae* protease showed the highest results, using the 2-difenyl-1-picryl-hydrazil -DPPH (59.70%) and deoxyribose (58.77%) methods, for the most of E:S ratios. Using the pyrogallol method, the highest values (48.70 to 90.76%) were found when the hydrolysis was conducted by the action of the *B. licheniformis* protease at all E: S ratios. The beneficial effect on cost saving of using the lowest E: S ratio (0.5:100) to obtain the highest values of antioxidant activity was observed for the *A. oryzae* and *A. sojae* proteases. For the former enzyme, this result was found when using the DPPH (38.93%) and deoxyribose (43.60%) methods, and for the second protease this occurred when using the pyrogallol method (47.18%).

Keywords: whey protein concentrate, antioxidant activity, enzyme:substrate ratio, enzyme type

INTRODUCTION

The formation of free radicals in the human body is an ongoing process that occurs in the cells through enzymatic and non-enzymatic reactions (Sarmadi; Ismail 2010; Kunwar; Priyadarsini 2011). When the production of free radicals is intense, an effective antioxidant system removes these reactive species by the action of certain enzymes such as superoxide dismutase and glutathione peroxidase, or by means of antioxidant compounds (vitamins, glutathione, carotenoids, flavonoids and trace elements, for example). These enzymes and compounds may be originated from the organism or be provided by the diet (Cerqueira et al. 2007; Valko et al. 2007; Vasconcellos et al. 2007).

In situations where there is a predominance of oxidant over antioxidant systems, a condition of oxidative stress is installed which has been associated to the physiopathology of many chronic diseases such as heart disease, autoimmune diseases and cancers (Vasconcelos et al. 2007; Sarmadi; Ismail 2010; Kunwar; Priyadarsini 2011).

In this sense, there is a growing interest in identifying the dietary antioxidants, which are essential to minimize the effects of the oxidative stress (Huang et al. 2005). Much attention has been directed to bioactive peptides obtained by enzymatic hydrolysis of various protein sources, which may have different functions such as anti-inflammatory, anti-hypertensive and antioxidant (Draaáková et al. 2010; Liu et al. 2010; Park et al. 2010; Peng et al. 2010).

Considering that varied hydrolytic conditions may be used for preparing protein hydrolysates, during this process the protein molecules are cleaved into a complex mixture containing peptides of different sizes and free amino acids. Therefore, aiming at obtaining reliable results for the antioxidant activity the use of different methods is needed. Additionally, according to Alves et al. (2010) the importance of the *in vitro* evaluation of the

antioxidant activity is associated to the fact a compound that shows a small value in this test will probably also exhibits low activity in vivo. In the current work, the evaluation of this property in WPC (whey protein concentrate) hydrolysates was carried out by different methods based on the reduction of free radicals by electron transfer (method of 2,2-diphenyl-1-picryl-hidrazyl - DPPH) and the ability of different compounds of scavenging hydroxyl radicals (deoxyribose method) or superoxide (method of pyrogallol auto-oxidation).

The novelties of the current work are associated to several points. To the best of our knowledge, this is the first report of a evaluation of the action of 4 enzymes and the use of a wide range of E:S ratio (from 0.5:100 to 8.0:100) for preparing WPC hydrolysates with the aim of determining their antioxidant activity. With respect to the evaluation of the antioxidant activity of WPC hydrolysates, there are no literature references on the use of the pyrogallol and deoxyribose methods. Additionally, to the author's knowledge this was the first time a study was conducted regarding the correlation among the methods used here to determine the antioxidant activity of WPC hydrolysates obtained by the action of a pancreatin and proteases from *B. licheniformis*, *A. sojae* and *A. oryzae*. Moreover, the current work is the first to assess the effect of the E:S ratio on the antioxidant activity of WPC hydrolysates.

The current work sought to optimize the enzymatic hydrolysis of WPC aiming to obtain protein hydrolysates with high antioxidant activity, by using four enzymes at six E:S ratio values.

MATERIAL AND METHODS

MATERIAL

WPC (Kerrylac 750) in powder form was kindly furnished by Kerry of Brazil Ltda. (Três Corações, MG, Brazil). Pancreatin (Corolase PP® from porcine pancreas, activity = 5.97 U mL⁻¹) and proteases from *Aspergillus sojae* (Corolase LAP®, activity = 0.63 U mL⁻¹), *Bacillus licheniformis* (Alcalase®, activity = 6.22 U mL⁻¹) and *Aspergillus oryzae* (Flavourzyme®, activity = 0.69 U mL⁻¹) were kindly furnished by AB Enzymes (Barueri, SP, Brazil). In this study, one unit protease (U mL⁻¹) activity was defined as the activity that liberates 1 µg of tyrosine per minute (µg Tyr x mL⁻¹ min⁻¹) under described conditions (Dias et al. 2008). The α-deoxyribose (code 121649), pyrogallol (code 16040) and DPPH (code D9132) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). All other reagents used in this work were of analytical grade.

METHODS

PREPARATION OF WPC HYDROLYSATES

Twenty-four WPC hydrolysates were prepared with (A) Protease from *Bacillus licheniformis*, pH 8, 60°C (H1-H6), (B) Protease from *Aspergillus oryzae*, pH 7, 50°C (H7-H12.), (C) Protease from *Aspergillus sojae*, pH 7, 50°C (H13-H18) and (D) Pancreatin, pH 7, 50°C (H19-H24). The E:S ratios were 0.5, 1, 2, 3, 4 and 8:100 for all enzymes.

WPC solutions (10%, w/v) were prepared in distilled water, which corresponded to 3.42% protein (w/v), and the pH was adjusted to 7.0 or 8.0 with a 3 mol L⁻¹ NaOH solution. Then, the WPC solutions were heated in an oil-bath with continuous stirring (stirrer 752A

model from Fisatom, São Paulo, SP, Brazil), and the enzymes were added in such a concentration to attain the desired enzyme:substrate ratios. The total reaction time was 5 h for all samples, and the hydrolytic reaction was stopped by heating at 75°C for 15 sec, followed by immediately cooling on ice bath until the temperature of 25 °C. The hydrolysates were freeze-dried (Freeze Dry System/FreeZone 4.5, model 77500, LABCONCO, Kansas City, MO, USA) and stored in the freezer (-4 °C) until analysis.

***In vitro* evaluation of antioxidant activity of protein hydrolysates**

The antioxidant activity of the hydrolysates was evaluated by three different methods based on the reduction of free radicals by electron transfer (method of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil - DPPH), the ability of different compounds of scavenging hydroxyl radicals (deoxyribose method) or superoxide (method of pyrogallol auto-oxidation).

DPPH method

The method described by Li et al. (2006) was used, with modifications. A volume of 1.5 mL of the hydrolysate solutions (100 mg.mL⁻¹) was mixed with 1.5 mL of a DPPH alcoholic solution (0.1 mmol.L⁻¹), and the mixture was allowed to stand at 25 °C for 20 minutes. Then, the mixture was incubated in a water bath, until reaching 60 °C and keeping this temperature for 20 minutes. Afterwards, the absorbance was measured in a spectrophotometer at 517 nm (model SP-2000UV, Bel Photonics, Osasco, Sao Paulo, Brazil). A mixture of 1.5 mL of the DPPH solution and 1.5 mL of distilled water was used as control.

The antioxidant activity of the hydrolysate solutions, expressed as scavenging percentage of the DPPH radicals (% SR) was calculated by the following equation:

$$\text{Antioxidant activity (\%SR)} = (\text{AC} - \text{AH}) / \text{AC} \times 100$$

where AC and AH are the absorbances of the control and hydrolysates, respectively.

Deoxyribose method

The method of the α -deoxyribose oxidation, proposed by Halliwell et al. (1987), with modifications, was used for evaluating the antioxidant activity of WPC hydrolysates against hydroxyl radicals (OH^\bullet). A volume of 0.2 mL of FeSO_4 solution (10 mmol.L^{-1}) was mixed with 0.2 mL of hydrolysate solutions (100 mg.mL^{-1}) for 5 minutes. Then, 1.0 mL of the α -deoxyribose solution (10 mmol.L^{-1}), 2.2 mL of sodium phosphate buffer (0.01 mol L^{-1} , pH 7.4) and 0.4 mL of hydrogen peroxide solution (10 mmol.L^{-1}) were added. The mixture was incubated at 37°C for 60 minutes and 1.0 mL of trichloroacetic acid solution (2.8 g% w/v) and 1.0 mL of thiobarbituric acid solution (0.8 g% w/v) were added. The tubes were heated at 100°C for 15 minutes, cooled to room temperature and centrifuged at 4000 rpm for 15 minutes (NT812centrifuge, New Technique, Piracicaba, São Paulo, Brazil). Finally, the absorbance of the red pigment in the supernatant was measured in spectrophotometer at 532 nm (SP-2000UV model, Bel Photonics, Osasco, Sao Paulo, Brazil). A mixture prepared without hydrolysates was used as control.

The antioxidant activity of the hydrolysates against hydroxyl radicals was measured as the inhibition percentage of α -deoxyribose oxidation, according to the formula below:

$$\text{Antioxidant activity (\% inhibition)} = (\text{AC} - \text{AH}) / \text{AC} \times 100$$

where AC and AH are the absorbances of the control and hydrolysates, respectively.

Pyrogallol method

The ability of the hydrolysates to scavenge superoxide radicals was evaluated by auto-oxidation of pyrogallol, proposed by Marklund; Marklund (1974) with modifications proposed by Tang et al. (2010). A mixture containing 2.8 mL of Tris buffer / HCl (50 mmol.L⁻¹, pH 8.2), 0.1 mL of hydrolysate solutions (100 mg.mL⁻¹) and 0.1 ml of pyrogallol solution (10 mmol.L⁻¹) dissolved in HCl (10 mmol.L⁻¹), was incubated at 25 ° C for 10 minutes. The auto-oxidation of pyrogallol was monitored at 320 nm in a spectrophotometer (model SP-2000UV, Bel Photonics, Osasco, Sao Paulo, Brazil) at 30 second intervals for 5 minutes. Absorbance curves were plotted versus time and the slopes were considered as the rate of pyrogallol oxidation. A mixture prepared without hydrolysates was used as control.

The antioxidant activity of the hydrolysates against superoxide radicals was expressed as the inhibition percentage of pyrogallol auto-oxidation, according to the formula below:

$$\text{Antioxidant activity (\% inhibition)} = (\text{AC} - \text{AH}) / \text{AC} \times 100$$

where Ac and AH are the rates of pyrogallol oxidation of the control and hydrolysates, respectively.

Evaluation of the effects of some parameters

The effects of the enzyme type and E: S ratio on the antioxidant activity of WPC hydrolysates was evaluated. Four enzymes (a pancreatin and the proteases from *B. licheniformis*, *A. oryzae*, *A. sojae*) were used for preparing the WPC hydrolysates, all at E: S ratios of 0.5:100, 1:100, 2:100, 3:100, 4:100 and 8:100.

Statistical analysis

The experiments were conducted in triplicate, and the results were expressed as mean \pm standard deviation. The randomized design in a factorial analysis scheme (4 enzymes x 6 enzyme: substrate ratios) was used to verify the presence of significant effects among the different treatments. Analysis of variance was used to determine the effects of the enzyme type and E: S ratio on the antioxidant activity of the samples and the significant differences ($p < 0.05$) between the means was evaluated by the Tukey test (Pimentel-Gomes, 2000). The correlations between the values of antioxidant activity obtained by the different methods were determined by the Pearson correlation coefficient (r) which measures the degree of association between two variables, and p was determined by the Student's t test using the software Bioestat (Ayres, 2007) for the data analysis.

RESULTS AND DISCUSSION

Antioxidant activity of WPChydrolysates

A great variability of the results obtained for the antioxidant activity can be observed in Table 1, ranging from 3.79% (H9) to 90.76% (H6). This could be explained by the use of enzymes with different modes of action and the varied hydrolytic conditions which should have led to the release of peptides with a wide range of abilities, chain sizes and chemical composition. In fact, according to some authors, the antioxidant activity of protein hydrolysates depends on factors such as ability to chelate transition metal ions and to scavenge free radicals, molecular mass, composition and amino acid sequence of the peptides (Marcuse, 1960, Jung et al . 1,995; Lin et al. 2012).

With respect to the composition of peptides, the presence of certain amino acid residues such as aromatic, hydrophobic or basic are considered essential for the antioxidant activity of peptides (Marcuse, 1960, Jung et al. 1995). Regarding the molecular mass of peptides, the literature reports are contradictory, because some works associate the highest values of the antioxidant activity to the more elevated molecular masses (Tong et al. 2000; Peña-Ramos; Xiong 2001; Penã-Ramos et al. 2004), whereas in others the low molecular weight peptides show higher results for the antioxidant activity (Pena-Ramos et al. 2004; Peng et al. 2009; Contreras et al. 2011; Kong et al. 2012; Zhang et al. 2012).

It is also apparent in Table 1 the statistical differences among the results obtained by the three methods for the same sample, and the highest values were obtained for the pyrogallol method for 13 samples (H2 to H6, H12, H17, H19 to H24), the deoxyribose method for nine samples (H1, H7 to H11, H13, H15 and H16) and the DPPH method only for two samples (H14 and H18).

TABLE 1

Among the 13 samples that showed the highest values with the pyrogallol method, five were obtained with the *B. licheniformis* protease and six with pancreatin. These two enzymes should have released a significant amount of amino acids or peptides capable of scavenging superoxide radicals that reduced the pyrogallol oxidation. In the case of the deoxyribose method, among the nine samples that produced the highest values, five were prepared with the *A. oryzae* protease and three with the *A. sojae* protease. These enzymes should have released amino acids or peptides with a great ability to prevent the degradation of this sugar. The two samples that showed the highest values with the DPPH method were prepared with the *A. sojae* protease indicating that this enzyme should also have released amino acids or peptides able to reduce DPPH.

With respect to the evaluation of the antioxidant activity of the WPC hydrolysates, no report was found in the literature on the use of the pyrogallol and deoxyribose methods. Only two studies addressing the DPPH method were found in the literature. Li et al. (2012) used four enzymes for preparing twelve WPC hydrolysates (pepsin, trypsin, Alcalase and Favourzyme) and obtained values of antioxidant activity varying from 42.9 to 62.0%, a range of values that are superior than most of the results reported here. Only the results obtained here for four hydrolysates (H4, H14, H18 and H24) were within this range.

Zhang et al. (2012) prepared WPC hydrolysates using a pepsin and a trypsin. The results of the antioxidant activity ranged from 15.0 to 55.0%, a range that covers most of the results obtained in the present work. Only the results obtained here for three hydrolysates (H2, H3 and H10) were below 15.0%.

Correlation among the methods for determining the antioxidant activity

The results of the correlation among the methods for determining the antioxidant activity are shown in Table 2. It can be observed an absence of significant correlation in all comparisons because none showed an r value above 0.7 as reported by Sampaio (2002).

TABLE 2

These results indicate the impossibility of comparing values of antioxidant activity obtained by different methods. In fact, according to Sarmadi; Ismail (2010), although there are several methods to evaluate the antioxidant activity, it is impossible to choose the best one because all methods show some inconvenient. Therefore, the evaluation of this property should be conducted by different methods as it was performed in the current work.

No report was found in the literature regarding the correlation among the same methods used in the current work to determine the antioxidant activity of WPC hydrolysates obtained by the action of a pancreatin and proteases form *B. licheniformis*, *A. sojae* and *A. oryzae*.

Effects of some parameters on the antioxidant activity

Changes in enzyme type and enzyme: substrate ratio (E:S) were evaluated for their effects on two different outcomes: the production of hydrolysates with high antioxidant activity and the reduction of costs for scaling-up the process (i.e., the ability to use low E:S ratios).

Effect of enzyme type

The influence of this parameter on the antioxidant activity of WPC hydrolysates can be seen in Figure 1. As shown in this figure, six groups were considered, each corresponding to a particular E:S ratio with other parameters held constant.

It can be seen in Figure 1A that for the DPPH method the action of the *A. sojae* protease was the most advantageous, because it led to the highest antioxidant activity at four E: S ratios (1.0:100; 2.0:100; 4.0:100 and 8.0: 100). In descending order of the antioxidant activity was the action of the *B. licheniformis* protease which showed the highest values at three E: S ratios (0.5:100; 3.0:100 and 4.0:100). No significant difference was observed with the result of the *A. sojae* protease at the E: S ratio of 4.0:100. The *A. oryzae* protease ranked in the third position because its action produced the highest results of antioxidant activity at two E: S ratios (0.5:100 and 2.0:100). No significant difference was observed with the results of the *B. licheniformis* and *A. sojae* proteases at the E: S ratios of 0.5:100 and 2.0:100, respectively. The worst performing enzyme was the pancreatin, producing results of antioxidant activity lower than the other enzymes at all E: S values.

FIGURE 1

The action of the *A. sojae* protease was the most advantageous (Figure 1B) when using the deoxyribose method, such as found for the DPPH method, because this enzyme gave rise to the greatest results of antioxidant activity at four E: S ratios (1:100 , 2:100, 3:100 and 8:100). The *B. licheniformis* and *A. oryzae* proteases were the second best, because these enzymes produced the highest results of antioxidant activity at two E: S ratios (0.5:100 and 4:100, 1:100 and 4:100, respectively). No significant difference between the results of these two enzymes was found at an E:S ratio of 4:100. The *B. licheniformis* and *A. oryzae* proteases were the second best, because these enzymes produced the highest results of antioxidant

activity at two E: S ratios (0.5:100 and 4:100, 1:100 and 4:100, respectively). No significant difference between the results of these two enzymes was found at an E:S ratio of 4:100. It is worth stating that the result of the antioxidant activity obtained with the *A. oryzae* protease was similar to that of the *A. sojae* protease at an E:S ratio of 1:100. The pancreatin ranked in the last position, such as found for the DPPH method, generating the highest result of the antioxidant activity only at an E: S of 8:100, whose value was significantly equal to that obtained for the *A. sojae* protease.

The higher results obtained by the *A. sojae* protease for the DPPH and deoxyribose methods compared to the other enzymes could be explained at least in part by the exopeptidase action of this enzyme (NC-IUBMB, 2010), leading to a higher release of free amino acids containing aromatic, basic or hydrophobic groups, essential for the antioxidant activity (Marcuse, 1960, Jiang et al. 1995).

The superiority of the action of the *B. licheniformis* protease can be seen in Figure 1C when using the pyrogallol method, generating the highest results of the antioxidant activity at all E: S ratios. This result can probably be explained by the fact that this enzyme is an endopeptidase of broad specificity that cleaves preferably peptide linkages next to hydrophobic amino acids (Doucet et al. 2003) which are free radical scavengers (Peña-Ramos et al. 2004; Dryáková et al. 2010). The second position is occupied by the pancreatin that produced results of antioxidant activity as high as those of the *B. licheniformis* protease at E: S ratios of 0.5:100 and 3:100. The *A. oryzae* and *A. sojae* proteases ranked in the last position because they were not able to produce the highest results of antioxidant activity at any E:S ratio.

Taken as a whole, the results obtained in this item show that the choice of the enzyme to hydrolyze proteins can affect the antioxidant activity of the hydrolysates, because the

action of different enzymes can release peptides with varied abilities and properties, as described above.

There were no reports in the literature that evaluated the effect of the enzyme type on antioxidant activity of WPC hydrolysates by the deoxyribose and pyrogallol methods. However, the DPPH method was used in two works. Lin et al. (2012) evaluated the antioxidant activity of WPC hydrolysates prepared with the *B. licheniformis* protease, and found values ranging from 42.9% to 60.0%, higher than most of the results when this same enzyme was used to obtain WPC hydrolysates in the present work. These differences can probably be explained by the differing parameters used in the preparation of enzymatic hydrolysates (pH, temperature and E:S ratio), besides the use of WPC with different protein contents which was of 34.2% and 77.5% in the current work and in that of Lin et al. (2012), respectively.

In the study by Zhang et al. (2012), the DPPH method was used to evaluate the antioxidant activity of WPC hydrolysates prepared with a pepsin and a trypsin. The antioxidant activity of the samples ranged from 15% to 55%. According to these authors, the presence of the amino acids leucine, valine and alanine in some samples favored the antioxidant activity of the hydrolysates.

Effect of E:S ratio

The influence of the E: S ratio on the antioxidant activity of WPC hydrolysates can be evaluated in figure 2, where the samples were divided into four groups, each corresponding to one enzyme. For the DPPH method (Figure 2A), the beneficial effect of using a lower E: S ratio in terms of cost saving was observed especially for the *A. oryzae* protease, because the highest antioxidant activity was obtained with an E: S of 0.5: 100. When using the

deoxyribose method (Figure 2B), this effect was found for the *B. licheniformis* and *A. oryzae* proteases with an E: S of 0.5:100. In case of the pyrogallol method (Figure 2C), the lowest value of E: S ratio which gave rise to the highest value of antioxidant activity was 2.0:100, obtained by the action of the *A. sojae* protease.

FIGURE 2

It can be inferred that in terms of cost saving the preparation of two samples would be more economically viable, because the use of the *A. oryzae* and *B. licheniformis* proteases with an E: S of 0.5:100 could lead to WPC hydrolysates with high antioxidant activity.

No report was found in the literature on the evaluation of the effect of the E: S ratio on the antioxidant activity of WPC hydrolysates by any of the methods used in the current work.

CONCLUSION

The antioxidant activity of the WPC hydrolysates was influenced by the enzyme type and E: S ratio. The use of the *A. sojae* protease was the most advantageous among all tested enzymes leading to the production of hydrolysates with the highest antioxidant activity at most E: S ratios. In some cases, it was observed that the use of the lowest E: S ratio (0.5:100) was advantageous for the *B. licheniformis* and *A. oryzae* proteases giving rise to the highest results of antioxidant activity.

Acknowledgements

The authors thank CNPq, CAPES and FAPEMIG for their financial support.

References

Alves CQ, David JM, David JP, Bahia MV, Aguiar RM. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. *Quim Nova* 2010; 33(10): 2202-2210.

Ayres M, Ayres Jr M, Ayres DL, Santos AAS. *BioEstat: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas*. Belém; Sociedade Civil Mamirauá: MCT-CNPq, 2007. Disponível em: <<http://www.mamiraua.org.br/downloads/programas>>. Acesso em 15 mar. 2012.

Cerqueira FM, Medeiros MHG, Augusto O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. *Quim. Nova* 2007; 30(2): 441-449.

Contreras MM, Hernández-Ledesma B, Amigo L, Martín-Álvarez PJ, Recio I. Production of antioxidant hydrolyzates from a whey protein concentrate with thermolysin: optimization by response surface methodology. *LWT – Food Sci Technol*. 2011; 44(1): 9-15.

Doucet D, Otter DE, Gauthier SF, Foegeding EA. Enzyme-induced gelation of extensively hydrolyzed whey proteins by Alcalase: peptide identification and determination of enzyme specificity. *J Agric Food Chem.*, 2003; 51(21): 6300-6308.

Dryáková A, Pihlanto A, Marnila P, Čurda L, Korhonen HJT. Antioxidant properties of whey protein hydrolysates as measured by three methods. *Eur Food Res Technol*. 2010; 230: 865–874.

Halliwell B, Gutteridge JMC, Aruoma OI. The deoxyribose method: a simple “test-tube” assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal Biochem* 1987; 165: 215-219.

Huang D, Ou B, Prior R. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem* 2005; 53(6): 1841-1856.

Jung MY, Kim SK, Kim SY. Riboflavin-sensitized photooxidation of ascorbic acid: kinetics and amino acid effects. *Food Chemistry* 2005; 53(4): 397-403.

Kong B, Peng X, Xiong YL, Zhao X. Protection of lung fibroblast MRC-5 cells against hydrogen peroxide-induced oxidative damage by 0.1-2.8 kDa antioxidative peptides isolated from whey protein hydrolysate. *Food Chem* 2012; 135(2): 540-547

Kunwar A, Priyadarsini KI. Free radicals, oxidative stress and importance of antioxidants in human health. *J Med Allied Sci* 2011; 1(2): 53-60.

Li L, Wang J, Zhao M, Cui C, Jiang Y. Artificial neural network for production of antioxidant peptides derived from bighead carp muscles with alcalase. *Food Technol Biotechnol* 2006; 44(3): 441-448.

Lin S, Tian W, Li H, Cao J, Jiang W. Improving antioxidant activities of whey protein hydrolysates obtained by thermal preheat treatment of pepsin, trypsin, alcalase and flavourzyme. *Int J Food Sci Technol* 2012; 47(10): 2045–2051.

Liu Q, Kong B, Xiong YL, Xia X. Antioxidant activity and functional properties of porcine plasma protein hydrolysates as influenced by the degree of hydrolysis. *Food Chem* 2010; 118: 403–410.

Marcuse R. Antioxidative effect of amino acids. *Nature* 1960; 186: 886-887.

Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 1974; 47: 469-474.

Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). Enzyme Nomenclature: recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the nomenclature and classification of enzymes by the reactions they catalyse. Londres: School of Biological and Chemical Sciences, Queen Mary University, 2010. Disponível em: <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme>>. Acesso em 20 fev. 2012.

Page MJ, Di Cera E. Serine peptidases: classification, structure and function. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65: 1220-1236.

Park SY, Lee JS, Baek HH, Lee HG. Purification and characterization of antioxidant peptides from soy protein hydrolysates. *J Food Biochem*. 2010; 34: 120-132.

Peña-Ramos EA, Xiong YL. Antioxidative activity of whey protein hydrolysates in a liposomal system. *J Dairy Sci*. 2001; 84: 2577-2583.

Peña-Ramos EA, Xiong YL, Arteaga GE. Fractionation and characterisation for antioxidant activity of hydrolysed whey protein. *J Sci Food Agric* 2004; 84:1908–1918.

Peng X, Xiong YL, Kong B. Antioxidant activity of peptide fractions from whey protein hydrolysates as measured by electron spin resonance. *Food Chem* 2009; 113(1): 196-201.

Peng X, Kong B, Xia X, Liu Q. Reducing and radical scavenging activities of whey protein hydrolysates prepared with Alcalase. *J Dairy J* 2010; 20:360–365.

Pimentel-Gomes, F. Curso de estatística experimental. 14. ed. Piracicaba: Nobel, 2000. 477 p.

Sampaio IBM. Estatística aplicada à experimentação animal. 2.ed. Belo Horizonte, MG: FEPMVZ, 2002. 265p.

Sarmadi BH, Ismail A. Antioxidative peptides from food proteins: a review. *Peptides* 2010; 31(10):1949-56.

Tang X, He Z, Dai Y, Xiong YL, Xie M, Chen J. Peptide fractionation and free radical scavenging activity of zein hydrolysate. *J Agric Food Chem* 2010; 58: 587-593.

Tong LM, Sasaki S, McClements DJ, Decker EA. Mechanisms of the antioxidant activity of a high molecular weight fraction of whey. *J Agric Food Chem*. 2000; 48(5):1473-8.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Tesler J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 44-84.

Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JBF, Manfredini V, Benfato MS, Kubota LT. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Quim. Nova* 2007; 30(5): 1323-1338.

Zhang QX, Ling YF, Sun Z, Zhang L, Yu HX, Kamau SM, Lu RR. Protective effect of whey protein hydrolysates against hydrogen peroxide-induced oxidative stress on PC12 cells. *Biotechnol Lett* 2012; 34(11): 2001-6.

Table 1: Antioxidant activity of WPC hydrolysates

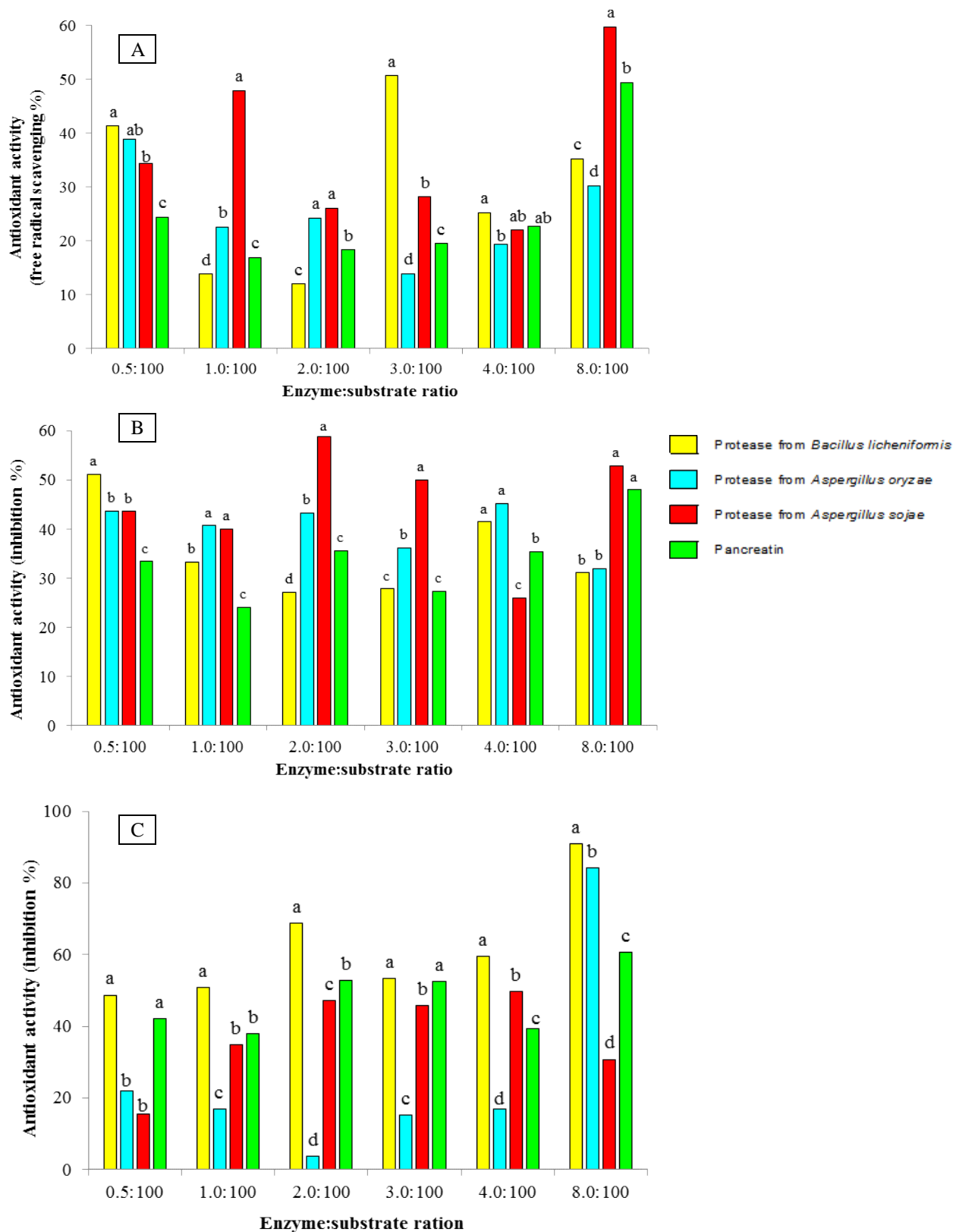
Hydrolysates	Antioxidant activity		
	DPPH method (radical scavenging %)	Deoxyribose method (Inhibition %)	Pyrogallol method (Inhibition %)
H1	41.33 ± 3.05 ^{Db}	51.11 ± 2.10 ^{BCa}	48.70 ± 4.19 ^{FGHa}
H2	13.80 ± 0.05 ^{Nc}	33.23 ± 2.84 ^{Hlb}	50.91 ± 0.65 ^{EFGa}
H3	12.01 ± 1.03 ^{Nc}	27.15 ± 2.67 ^{JKb}	68.78 ± 2.64 ^{Ca}
H4	50.67 ± 1.57 ^{Ba}	27.78 ± 2.72 ^{Jb}	53.25 ± 0.21 ^{Ea}
H5	25.20 ± 2.60 ^{Ic}	41.39 ± 2.37 ^{FGb}	59.56 ± 4.70 ^{Da}
H6	35.20 ± 1.10 ^{Fb}	30.99 ± 1.60 ^{Ib}	90.76 ± 0.67 ^{Aa}
H7	38.93 ± 1.81 ^{Eb}	43.60 ± 2.03 ^{EFa}	22.05 ± 1.11 ^{Nc}
H8	22.59 ± 0.48 ^{Kb}	40.66 ± 0.14 ^{FGa}	16.95 ± 0.37 ^{Oc}
H9	24.24 ± 0.32 ^{IJKb}	43.25 ± 1.06 ^{EFGa}	3.79 ± 0.33 ^{Pc}
H10	13.87 ± 0.63 ^{Nb}	36.14 ± 0.40 ^{Ha}	15.28 ± 1.09 ^{Ob}
H11	19.30 ± 0.54 ^{Lb}	45.13 ± 0.31 ^{DEa}	17.04 ± 0.96 ^{Ob}
H12	30.19 ± 0.64 ^{Gb}	31.93 ± 2.45 ^{Ib}	84.26 ± 3.69 ^{Ba}
H13	34.31 ± 0.18 ^{Fb}	43.50 ± 1.09 ^{EFa}	15.48 ± 0.96 ^{Oc}
H14	47.85 ± 1.11 ^{Ca}	39.92 ± 3.01 ^{Gb}	34.94 ± 2.94 ^{Lc}
H15	26.10 ± 1.47 ^{Hlc}	58.77 ± 0.39 ^{Aa}	47.18 ± 0.97 ^{GHb}
H16	28.15 ± 1.23 ^{GHb}	49.96 ± 4.40 ^{BCa}	45.85 ± 1.98 ^{Hla}
H17	21.98 ± 1.74 ^{Kb}	25.93 ± 1.96 ^{JKb}	49.78 ± 2.97 ^{EFGHa}
H18	59.70 ± 0.54 ^{Aa}	52.78 ± 2.68 ^{Bb}	30.79 ± 1.85 ^{Mc}
H19	24.41 ± 2.57 ^{IJKc}	33.35 ± 0.97 ^{Hlb}	42.05 ± 3.65 ^{IJa}
H20	16.89 ± 0.91 ^{Mc}	23.96 ± 0.59 ^{Kb}	37.81 ± 3.31 ^{KL a}
H21	18.30 ± 0.83 ^{LMc}	35.58 ± 1.17 ^{Hb}	52.83 ± 2.94 ^{EFa}
H22	19.46 ± 0.30 ^{Lc}	27.28 ± 0.80 ^{JKb}	52.46 ± 1.93 ^{EFa}
H23	22.64 ± 0.53 ^{JKb}	35.35 ± 1.67 ^{Hla}	39.43 ± 1.99 ^{JKa}
H24	49.44 ± 0.62 ^{BCb}	47.90 ± 0.45 ^{CDb}	60.67 ± 0.41 ^{Da}

WPC = whey protein concentrate. Values represent the means of triplicate experiments ± standard deviation. Different capital (column) and small (line) letters represent significantly different ($p < 0.05$) values. H1 to H6: hydrolysates prepared using *B. licheniformis* protease. H7 to H12: hydrolysates prepared using *A. oryzae* protease. H13 to H18: hydrolysates prepared using *A. sojae* protease. H19 to H24: hydrolysates prepared using pancreatin.

Table 2 – Correlation among the methods for determining the antioxidant activity

Comparisons	r	p
DPPH with Deoxyribose	0.4167	0.3849
DPPH with Pyrogallol	0.0549	0.0279
Deoxyribose with Pyrogallol	-0.3364	0.2350

r: correlation; p: determined by t-Student test with significant differences for $p < 0.05$. DPPH: 2,2-diphenyl-1-picryl-hidrazyl.



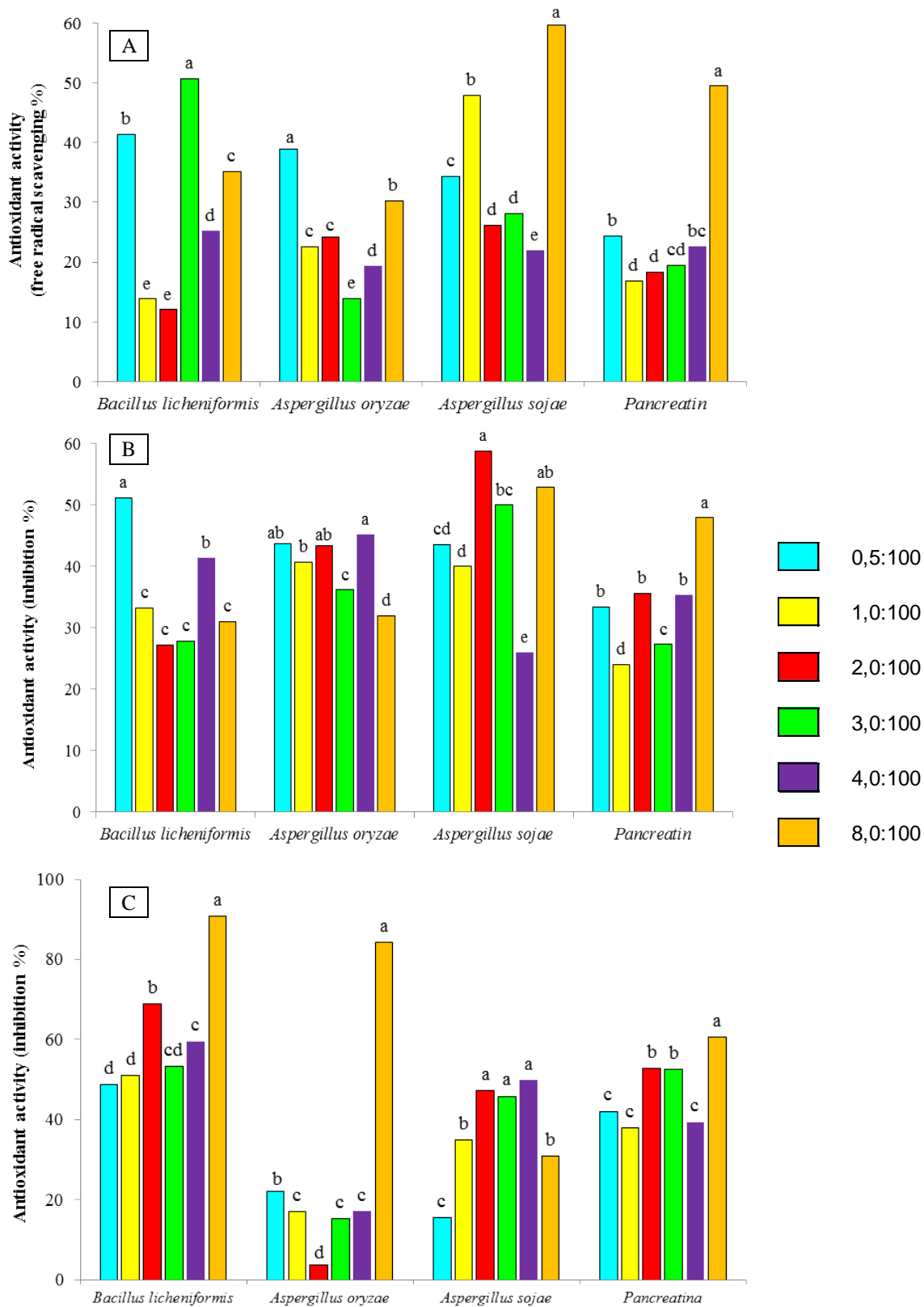


Figure 2 – Effect of the enzyme:substrate ratio on the antioxidant activity of WPC hydrolysates. A: DPPH method; B: Deoxyribose method; C: Pyrogallol method. The results represent the means of triplicates. Different letters represent significantly different ($p < 0.05$) values, for different enzyme:substrate ratios and the same enzyme.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No primeiro capítulo deste trabalho, verificou-se que a composição química do concentrado proteico de soro de leite mostrou estar próxima dos valores de referência, mesmo existindo diversos fatores capazes de influenciar nesta avaliação. Uma vez caracterizada a matéria-prima, realizou-se o tratamento enzimático das proteínas do WPC. Além disso, nas condições hidrolíticas empregadas, foi possível a obtenção de hidrolisados proteicos com altos teores de di- e tripeptídeos e de aminoácidos livres e baixos de grandes peptídeo (> 7 resíduos de aminoácidos). Dentre os parâmetros avaliados, verificou-se que a ação da pancreatina foi a mais eficiente, quando comparada com as demais enzimas (proteases de *Bacillus licheniformis*, de *Aspergillus oryzae* e de *Aspergillus sojae*), tendo em vista que levou à produção dos hidrolisados com os maiores teores de oligopeptídeos (frações F3 e F4) e os menores de grandes peptídeos (fração F1), o que é vantajoso do ponto de vista nutricional.

Neste sentido, é importante destacar que os melhores resultados encontrados para a pancreatina podem estar associados ao fato desta enzima possuir função mista (endo- e exopeptidase), além de ter apresentado a maior atividade, dentre as enzimas testadas, fatores estes que propiciaram uma hidrólise mais eficiente das proteínas do WPC.

O efeito benéfico, associado à redução de custos para o escalonamento do processo, do emprego de uma baixa relação E:S levando a um teor elevado de oligopeptídeos, também foi observado em alguns casos para três das enzimas testadas (pancreatina e proteases de *Aspergillus oryzae* e de *Aspergillus sojae*). Este resultado é relevante, tendo em vista que o emprego de menor relação E:S, necessária para a hidrólise, é um dos fatores a ser considerado para a adaptação em larga escala da produção de hidrolisados proteicos.

Nos capítulos 2 e 3 desta tese, para a melhor caracterização dos hidrolisados, realizaram-se estudos com o intuito de comparar diferentes metodologias (titulação com formol, teor de proteínas solúveis, derivatização com OPA e osmometria) para avaliar o grau de hidrólise (GH) das proteínas do soro de leite (WPC), relacionando estes resultados com o perfil peptídico das amostras. Verificou-se que, de maneira geral, os maiores valores do GH foram obtidos quando se utilizou o método do teor de proteínas solúveis, para três das enzimas estudadas (pancreatina, proteases de *Bacillus licheniformis* e de *Aspergillus oryzae*). Todavia, a metodologia da titulação com formol mostrou-se mais adequada para avaliar este parâmetro em função do tempo de reação hidrolítica. Esta técnica ainda merece ser destacada,

tendo em vista que trata-se de um procedimento proposto no início do século XX, simples e baseado em volumetria, e que mostrou ser adequado para mensurar o grau de hidrólise do concentrado proteico do soro de leite.

Além disso, em vários casos, observou-se uma correlação positiva e significativa entre o GH e os teores di- e tripeptídeos ou de aminoácidos livres, e uma correlação negativa com os teores de grandes peptídeos. A partir destes estudos, foi possível estabelecer uma relação entre o perfil peptídico e o grau de hidrólise, de forma que estas duas variáveis poderão ser empregadas no acompanhamento do processo de hidrólise, garantindo assim melhor controle da qualidade dos produtos obtidos.

Na etapa final desta tese, foram avaliadas as propriedades anti-hipertensiva (capítulo 4) e antioxidante (capítulo 5) dos hidrolisados proteicos, tendo em vista a utilização futura destes hidrolisados como fonte proteica no desenvolvimento de produtos voltados para crianças e adolescentes obesos e hipertensos. No primeiro caso, verificou-se que dos 24 hidrolisados avaliados, 11 exibiram atividade muito alta de inibição da ECA *in vitro* (> 80%) e outros cinco apresentaram alta atividade (> 70%). Considerando que a ação inibitória da ECA tem sido atribuída a peptídeos de baixa massa molecular, usualmente com 2 a 12 resíduos de aminoácidos, e que muitos destes peptídeos podem resistir à hidrólise no trato gastrointestinal e à ação das peptidases intracelulares, estes resultados apontam para a importância da inclusão destes hidrolisados em suplementos alimentares.

Com relação à atividade antioxidante, de maneira geral, os melhores resultados foram obtidos com a protease de *Aspergillus sojae*, a qual por sua vez não levou a produção de hidrolisados com significativa atividade inibitória da ECA. Considerando que diferentes tipos de radicais livres promovem o estresse oxidativo, a combinação de hidrolisados obtidos por distintas enzimas, como fonte proteica de suplementos alimentares, pode ser interessante, visto que em função do mecanismo catalítico das proteases, o tipo de aminoácido liberado influenciará na habilidade do peptídeo em sequestrar um radical livre ou em reagir com este, controlando assim o estado redox da célula.

Analisando-se todos os resultados em conjunto, entre todas as enzimas testadas, elegeu-se a protease de *Bacillus licheniformis* como a mais vantajosa para produção de hidrolisados em larga escala. Tal escolha baseia-se no fato de que por ser de origem microbiana, reduz-se os custos associados a sua produção para uso industrial, e por ser de grau alimentício, o preparado comercial disponível no mercado necessariamente deve atender a requisitos de segurança alimentar preconizados pelas agências de vigilância sanitária de

diferentes países. Além disso, nas condições testadas nesta pesquisa, a ação desta enzima originou hidrolisados proteicos não só com perfis peptídicos adequados para uso em suplementos alimentares, mas também com propriedades antioxidante e inibidora da ECA.

Embora, do ponto de vista nutricional dos produtos obtidos, a pancreatina também se destaque, os hidrolisados obtidos com esta enzima exibiram resultados das propriedades bioativas inferiores aos relatados para a protease de *Bacillus licheniformis*. Além disso, o fato de ser uma enzima de origem animal pode dificultar sua obtenção em quantidades suficientes para uso em escala industrial. Com relação à ação da protease de *Aspergillus sojae*, se por um lado esta enzima tenha levado à obtenção de hidrolisados protéicos com resultados relevantes na avaliação da propriedade antioxidante, por outro lado produziu os perfis peptídicos mais desvantajosos, do ponto de vista nutricional, e inexpressiva atividade inibitória ECA. Já, a protease de *Aspergillus oryzae* não originou qualquer hidrolisado com características nutricionais ou bioativas que justificassem sua utilização na produção em larga escala, nas condições hidrolíticas avaliadas nesta pesquisa.

Cabe aqui mencionar que foram várias as inovações científicas desta tese, destacando-se que este trabalho representa a primeira vez que:

- comparou-se a ação de um grande número de enzimas, sendo três de origem microbiana (proteases de *Bacillus licheniformis*, de *Aspergillus oryzae* e de *Aspergillus sojae*) e a pancreatina, em ampla faixa de relação E:S (de 0,5:100 a 8,0:100), condições essas ainda não relatadas anteriormente na literatura para as proteínas do soro de leite, com relação ao perfil peptídico, à atividade inibitória da ECA e à atividade antioxidante;
- relatou-se o uso dos métodos do teor de proteína solúvel e da osmometria para a avaliar o GH de hidrolisados enzimáticos de WPC, obtidos pela ação das 4 enzimas citadas acima;
- determinou-se o GH, pelo métodos do OPA, para hidrolisados de WPC preparados com as proteases de *Aspergillus sojae* e *Aspergillus oryzae*, e pela titulação com formol, para a pancreatina e a protease de *Aspergillus oryzae*;
- realizou-se uma comparação entre os resultados obtidos pelos métodos da titulação com formol, da derivatização com OPA, do teor de proteína solúvel e da osmometria, para a determinação do GH de hidrolisados enzimáticos de WPC, obtidos pela ação da pancreatina e das proteases de *Bacillus licheniformis*, de *Aspergillus oryzae* e de *Aspergillus sojae*;

- comparou-se os os resultados obtidos pelos métodos do DPPH, da auto-oxidação do pirogalo e da desoxirribose para a avaliação da atividade antioxidante de hidrolisados de WPC, obtidos pela ação da pancreatina e das proteases de *Bacillus licheniformis*, de *Aspergillus sojae* e de *Aspergillus oryzae*, sendo que não foram encontrados trabalhos na literatura abordando o uso destas duas últimas metodologias.

Finalmente, pode-se concluir que a realização deste trabalho possibilitou a obtenção de proteínas hidrolisadas de soro de leite (WPC), com elevado valor nutricional e propriedades anti-hipertensiva e antioxidante significativas, as quais poderiam ser empregadas como fonte proteica no desenvolvimento de formulações para a prevenção de doenças crônicas não-transmissíveis na infância, com especial atenção para a obesidade.

ANEXO A – ATA DA DEFESA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - SAÚDE DA
CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

UFMG

ATA DA DEFESA DE TESE DO ALUNO HARRIMAN ALEY MORAIS

Realizou-se, no dia 25 de junho de 2013, às 14:00 horas, sala 528, 5º andar, Faculdade de Medicina/UFMG, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de tese, intitulada "PROTEÍNAS HIDROLISADAS DE SORO DE LEITE COM PROPRIEDADES BIOATIVAS ASSOCIADAS À REDUÇÃO DE FATORES DE RISCO DE DOENÇAS NA INFÂNCIA", apresentada por HARRIMAN ALEY MORAIS, graduado no curso de MEDICINA VETERINÁRIA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em CIÊNCIAS DA SAÚDE - SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE, à seguinte Comissão Examinadora: Profª. Marialice Pinto Coelho Silvestre - Orientadora (UFMG), Profª. Ana Cristina Simões e Silva (UFMG), Profª. Monica Cristina de Oliveira (UFMG), Prof. Alexandre Soares dos Santos (UFVJM), Profª. Etel Rocha Vieira (UFVJM).


CONFERE COM ORIGINAL
Centro de Pós-Graduação
Faculdade de Medicina - UFMG

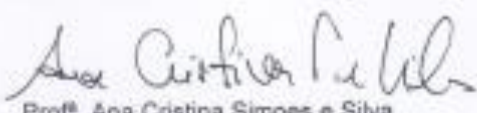
A Comissão considerou a tese:


- Aprovada
 Aprovada condicionalmente, sujeita a alterações, conforme folha de modificações, anexa
 Reprovada

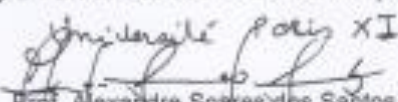
Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.


Belo Horizonte, 25 de junho de 2013.


Profª. Marialice Pinto Coelho Silvestre
Doutora - Institute National de Recherche Agronomique Et Uni


Profª. Ana Cristina Simoes e Silva
Doutora - UFMG


Profª. Monica Cristina de Oliveira
Doutora - Université Claude Bernarde Lyon 1.


Prof. Alexandre Soares dos Santos
Doutor - UFRJ


Profª. Etel Rocha Vieira
Doutora - UFMG

ANEXO B – FOLHA DE APROVAÇÃO




FOLHA DE APROVAÇÃO

"PROTEÍNAS HIDROLISADAS DE SORO DE LEITE COM PROPRIEDADES BIOATIVAS ASSOCIADAS À REDUÇÃO DE FATORES DE RISCO DE DOENÇAS NA INFÂNCIA"


HARRIMAN ALEY MORAIS

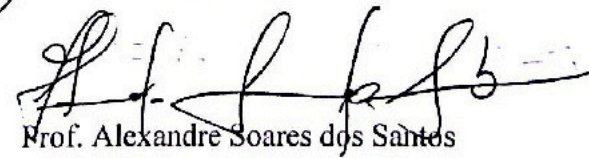
Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS DA SAÚDE - SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE, como requisito para obtenção do grau de Doutor em CIÊNCIAS DA SAÚDE - SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE, área de concentração SAÚDE DA CRIANÇA

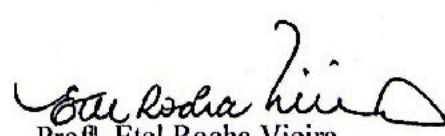
Aprovada em 25 de junho de 2013, pela banca constituída pelos membros:


 Prof.^a Marialice Pinto Coelho Silvestre - Orientador
 UFMG


 Prof.^a Ana Cristina Simoes e Silva
 UFMG


 Prof.^a Monica Cristina de Oliveira
 UFMG


 Prof. Alexandre Soares dos Santos
 UFVJM


 Prof.^a Etel Rocha Vieira
 UFVJM

Belo Horizonte, 25 de junho de 2013.