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

# ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA APRESENTADA POR HIDROLISADOS ENZIMÁTICOS OBTIDOS DE SUBPRODUTOS DA CORVINA (*Micropogonias furnieri*)

**CAROLINA MORONI SILVA**

**PROF. DR. CARLOS PRENTICE-HERNÁNDEZ**
**Orientador**

**RIO GRANDE, RS**
**2014**

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

# ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA APRESENTADA POR HIDROLISADOS ENZIMÁTICOS OBTIDOS DE SUBPRODUTOS DA CORVINA (*Micropogonias furnieri*)

**CAROLINA MORONI SILVA**
**Engenheira de Alimentos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos

**Prof. Dr. CARLOS PRENTICE-HERNÁNDEZ**
**Orientador**

**RIO GRANDE, RS**
**2014**

S586a Silva, Carolina Moroni.
Atividade antioxidante e antimicrobiana apresentada por hidrolisados enzimáticos obtidos de subprodutos da corvina (*Micropogonias furnieri*) / Carolina Moroni Silva. – 2014.
80 f.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande /FURG; Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos.

Orientador: Dr. Carlos Prentice-Hernández.

1. Atividade antioxidante. 2. Atividade antimicrobiana. 3. Isolado proteico de corvina. 4. Ossos de corvina. 5. Peptídeos bioativos. Prentice-Hernández, Carlos. II. Título.

CDU 664

Catalogação na fonte: Bibliotecária Flávia Reis de Oliveira CRB10/1946

**DEDICATÓRIA**

**Aos meus pais, Nair e Vilson e aos meus irmãos, Luciana e Humberto pelo amor, apoio e compreensão.**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por não me deixar desistir, pela proteção e força ao longo deste trabalho.

Aos meus pais Nair e Vilson, pelo amor, compreensão e força nos momentos difíceis, formação de caráter e apoio em toda a graduação, mestrado e doutorado.

Aos meus irmãos Luciana e Humberto, por me ajudarem nas muitas vezes que pedi ajuda.

Ao meu cunhado Alberto, pela paciência e amizade.

Aos professores e técnicos da FURG, que me auxiliaram em algum momento no desenvolvimento desta tese.

Ao laboratório de Microbiologia e Biosseparações e ao laboratório de Ciências Biológicas por contribuírem com os ensaios realizados nesta tese.

Aos meus vizinhos Carmem, Noeli, Luise e Jocemar pela amizade, companheirismo e pelos momentos de alegria e descontração.

Ao meu orientador Carlos, pela oportunidade, pelo aprendizado, paciência e orientação.

A Elisane, Ariane e Renata, pela amizade, força nos momentos difíceis, me ajudando a suportar a distância das pessoas queridas e pelos momentos de alegria e descontração.

Aos doutores William e Michele e aos alunos de Iniciação Científica Giordan, Adriane e Alexandre, pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu amigo Felipe, pela amizade e por me ajudar em vários momentos e sempre que meu computador apresentava problemas.

Ao pessoal do LTA, pelo companheirismo e auxilio nas atividades desenvolvidas no laboratório.

À secretaria da pós-graduação Islanda, por toda a calma e ajuda em todo o andamento do meu mestrado e doutorado.

Ao REUNI, a CAPES e ao CNPq, pela bolsa de doutorado e financiamento do projeto e a FURG, por proporcionar o desenvolvimento desta tese.

Aos membros da banca, pela disponibilidade e contribuições dadas através das correções.

**RESUMO**

A corvina (*Micropogonias furnieri*) é a principal espécie processada pelas indústrias de Rio Grande, na Região sul do Brasil. Desse processamento é descartado e ou subutilizada grande quantidade de subprodutos (carcaça, pele, vísceras), se tornando necessário encontrar meios de aproveitamento dessa matéria, uma vez que estes subprodutos apresentam uma quantidade valiosa de proteínas. Um método eficiente para o aproveitamento destas proteínas é a hidrólise enzimática para obtenção de peptídeos bioativos. Maior atenção tem se concentrado sobre peptídeos com atividades antioxidantes devido aos radicais livres que são gerados pela oxidação, um processo vital em todos os organismos vivos, sendo que estes radicais estão relacionados com muitas doenças tais como: doenças do coração, arteriosclerose e câncer e sobre atividade antimicrobiana (PAM), devido aos PAM apresentarem uma atividade microbicida rápida e potente contra inúmeros micro-organismos. Desta forma o objetivo deste trabalho foi obter peptídeos bioativos, a partir de um processo de hidrólise enzimática, utilizando como substratos o isolado proteico obtido da carne mecanicamente separada de corvina (IP) e ossos de corvina (OC). A reação de hidólise ocorreu em banho termostatizado, utilizando três enzimas em separado: Alcalase (pH 8,0 e 50 °C), Flavourzyme (pH 7,0; 50 °C) e Protamex (pH 7,0; 40 °C). A concentração de enzima e substrato proteico foi de $1{:}10_{(U/g)}$ segundo a atividade específica de cada uma (Alcalase 99,75 U/g, Flavourzyme 2,07 U/g e Protamex 8,41 U/g), quando o processo de hidrólise se tornou constante a reação foi interrompida pela inativação da enzima à 90°C/10 min. Foi então realizado o fracionamento dos peptídeos pelo método de ultrafiltração, nas fraçõe maiores que 3 kDa foram avaliadas as atividades antioxidantes e antimicrobianas, sendo que a fração obtida dos OD, utilizando a enzima Protamex apresentou atividade antioxidante, onde em concentrações de 1,0 mg/mL, pode se observar uma diminuição de espécies reativas de oxigênio no interior da células de hepatócitos de Zebrafish. A fração obtida do IP utilizando a Flavourzyme e a fração obtida dos OD utilizando a Alcalase apresentaram zona de inibição para a bactéria *Salmonella* Enteritidis, valores estes de 48,0 mm e 54,7 mm, respectivamente, já para a bactéria *Staphylococcus* coagulase positiva três frações apresentaram zona de inibição, uma obtida do IP utilizando a Alcalase e duas dos OD uma utilizando a Alcalase e outra a Protamex, com zona de inibição de 37,3, 32,7 mm e 69,3 mm, respectivamente. Com esses resultados pode-se concluir que os subprodutos da corvina, podem ser uma fonte de peptídeos bioativos, a fim de avaliar a incorporação destes em alimentos funcionais.

**Palavras-chave:** Atividade antioxidante, atividade antimicrobiana, isolado proteico de corvina, ossos de corvina, peptídeos bioativos.

**ABSTRACT**

Whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*) is the main specie processed by Rio Grande industries in southerv Brazil. From this processing, a large amount of byproducts (carcasses, skin, offal) are discarded, making it necessary to find means to use this material. Since these byproducts have a number of valuable proteins. An efficient method for the utilization of these proteins is the enzymatic hydrolysis to obtain bioactive peptides. Increased attention has focused on antioxidant activity due to oxidation, which is a vital process in all live organisms, and its effect generates free radicals which are linked to many diseases such as heart disease, atherosclerosis, and cancer and has on antimicrobial ativicty, due since these have a rapid and powerful microbicidal activity against numerous micro-organisms. Thus the aim of this study was to obtain bioactive peptides from a process of enzymatic hydrolysis, using the protein isolate obtained from meat that is mechanically separated from croaker (PI) and croaker bones (CB) as substrates. The hydrolysis reaction occurred in a thermostated bath using three separate: Alcalase (pH 8.0, 50 °C), Flavourzyme (pH 7.0, 50 °C) and Protamex (pH 7.0, 40 °C), the enzyme concentration and protein substrate was 1:10 ($_{U/g}$) according to each specific activity (Alcalase 99.75 U/g, Flavourzyme 2.07 U/g and Protamex 8.41 U/g) and when the hydrolysis process became constant, the reaction was stopped by inactivating the enzyme at 90 °C/10 min. It was then held fractionation of peptides by ultrafiltration method, the 3 kDa larger than fraçõe antioxidant and antimicrobial activities were evaluated, and the fraction obtained from the OD Protamex using the enzyme showed antioxidant activity, and at concentrations of 1.0 mg / mL, can observe a reduction of reactive oxygen species inside the cells of zebrafish hepatocytes. The fraction obtained using the IP Flavourzyme and the fraction of OD obtained using Alcalase showed zone of inhibition for *Salmonella* Enteritidis, values of 48.0 mm and 54.7 mm, respectively, while for the bacteria *Staphylococcus* coagulase positive three fractions exhibited zone of inhibition obtained from one IP using Alcalase one and two of OD using Alcalase and another Protamex with inhibition zone 37.3, 32.7 mm and 69.3 mm, respectively. With these results it can be concluded that the products of croaker, can be a source of bioactive peptides to assess their incorporation into functional foods.

**Keywords:** Activity antioxidant, activity antimicrobial, protein isolate from croaker, croaker bones, bioactive peptide.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição proximal da carne mecanicamente separada (CMS) e do isolado proteico (IP). ..... 41
Tabela 2: Composição proximal dos Ossos (O) e dos Ossos desmineralizados (OD). ..... 41
Tabela 3: Porcentual de tirosina livre dos hidrolisados proteicos obtidos pela hidrólise do isolado proteico (IP) e dos ossos desmineralizados (OD)..... 45

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Corvina (*Micropogonias furnieri*) ..... 15
Figura 2: Mecanismo de ação proposto para peptídeos antimicrobianos ..... 26
Figura 3: Fluxograma do processo de obtenção de isolado proteico obtido a partir do subproduto da corvina. ..... 32
Figura 4: Fluxograma do processo de desmineralização dos ossos de corvina e remoção de algumas proteínas não colagenosas. ..... 34
Figura 5: Fluxograma geral do processo de hidrólise enzimática do isolado proteico (IP) e dos ossos desmineralizados (OD) de corvina ..... 36
Figura 6: Gráfico do grau de hidrolise, para as enzimas: (□) Alcalase, (○) Flavourzyme e (Δ) Protamex (a), utilizando como substrado (a) IP e (b) OD. ..... 43
Figura 7: Concentração de grupos sulfidrílas das diferentes amostras de peptídeos.... ..... 46
Figura 8: Viabilidade das células de hepatócitos de Zebrafish, frente à fração peptídica do hidrolisado do OD, obtido utilizando a enzima Protamex (>3 kDa). ..... 49
Figura 9: Especies reativas ao oxigênio intracelular em células de hepatócitos de Zebrafish, frente à fração peptídica do hidrolisado do OD, obtido utilizando a enzima Protamex (>3 kDa).. ..... 50
Figura 10: Zona de inibição para os testes de atividade antimicrobiana de 6 frações de peptídeos (> 3kDa), contra *S.* Enterididis e *S.* coagulase positiva ..... 54
Figura 11: Zona de inibição das frações de peptídeos contra as bactérias testadas ..... 57

**SUMÁRIO**

1 INTRODUÇÃO ..... 11
2 OBJETIVOS ..... 13
2.1 OBJETIVO GERAL ..... 13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS ..... 13
3 REVISÃO DA LITERATURA ..... 14
3.1 PESCADO ..... 14
3.2 PROTEÍNAS DE ORIGEM ANIMAL ..... 15
3.3 ISOLADO PROTEICO ..... 17
3.4 PROCESSO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA ..... 18
3.5 ULTRAFILTRAÇÃO ..... 20
3.6 PEPTÍDEOS BIOATIVOS ..... 20
3.7 ATIVIDADE ANTIMIOXIDANTE ..... 22
3.8 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA ..... 24
3.9 *SALMONELLA* ENTERITIDIS E *STAPHYLOCOCCUS* COAGULASE POSITIVA ..... 27
3.10 APLICAÇÃO DOS PEPTIDEOS BIOATIVOS ..... 30
4 MATERIAL E MÉTODOS ..... 30
4.1 MATÉRIA-PRIMA ..... 30
4.2 INFRAESTRUTURA ..... 30
4.3 ENZIMAS, CULTURA CELULAR E REAGENTES ..... 30
4.4 MICRO-ORGANISMOS ..... 31
4.5 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DAS AMOSTRAS ..... 31
4.6 OBTENÇÃO DA CARNE MECANICAMENTE SEPARADA DE CORVINA (CMS) ..... 31
4.7 OBTENÇÃO DO ISOLADO PROTEICO DE CORVINA (IP) ..... 31
4.8 OBTENÇÃO DOS OSSOS DE CORVINA ..... 33
4.9 PROCESSO DE DESMINERALIZAÇÃO DOS OSSOS DE CORVINA ..... 33
4.10 CONCENTRAÇÃO DE TIROSINA LIVRE ..... 35
4. 11 ATIVIDADE PROTEOLÍTICA ESPECÍFICA ..... 35
4.12 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA ..... 35
4.13 GRAU DE HIDRÓLISE ..... 37
4.14 FRACIONAMENTO DOS PEPTIDEOS OBTIDOS DO IP E DOS OD ..... 37
4.15 DETERMINAÇÃO DE GRUPOS SULFIDRILA (-SH) ..... 38
4.16 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE ‘IN VIVO’ ..... 38
4.16.1 CULTURA CELULAR ..... 38

4.16.2 VIABILIDADE CELULAR.....39
4.16.3 DETERIMINAÇÃO DA FUNCIONALIDADE DA DESIDROGENASE MITOCONDRIAL.....39
4.16.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INTRACELULAR DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO .....39
4.17 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....39
4. 18 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....40
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....41
5.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA CARNTE MECANICAMENTE SEPARADA (CMS), DO ISOLADO PROTEICO (IP), DOS OSSOS (O) E DOS OSSOS DESMINERALIZADS (OD) DE CORVINA....41
5.2 HIDROLISE ENZIMÁTICA DO IP E DOS OD DE CORVINA. .....42
5.3 CONCENTRAÇÃO DE GRUPOS SULFIDRILAS. .....46
5.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....48
5.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA .....53
6 CONCLUSÃO.....59
7 PERSPECTIVAS.....60
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....61
APÊNDICE 1.....79
APÊNDICE 2.....80

# 1 INTRODUÇÃO

A produção de pescado do Brasil, para o ano de 2010, foi de 1.264.765 t, registrando-se um incremento de 2% em relação a 2009, quando foram produzidas 1.240.813 t de pescado (BRASIL, 2010). A corvina é a principal espécie processada pelas indústrias de Rio Grande, mas comercialmente atinge baixo valor, comparada com outras espécies regionais, apesar dessa espécie ser capturada nas quatro estações do ano e apresentar grande disponibilidade (CENTENARO et al., 2009). Essas indústrias geram elevada quantidade de subprodutos (carne mecanicamente separada, ossos e pele), que são destinados para a fabricação de farinha ou são descartados (OVISSIPOUR et al., 2009). Uma alternativa para valorar estes subprodutos, é o aproveitamento destas proteínas para produção de compostos bioativos.

A partir desses subprodutos é possível obter peptídeos bioativos, mediante um processo proteolítico enzimático em que as enzimas atuam como catalisadores biológicos que aceleram a hidrólise das proteínas, tendo como resultado a clivagem das ligações peptidicas, produzindo peptídeos de diferentes tamanhos e aminoácidos livres (ZAVAREZE et al., 2009).

Proteínas e peptídeos bioativos são obtidos de fontes animais e vegetais, também presentes em sangue bovino, gelatina, carne, ovos e diversas espécies de peixes como: atum, sardinha, arenque e salmãos, mas também em trigo, milho, soja, arroz, cagumelos, abóbora e sorgo, onde as proteínas bioativas tem sido diretamente detectadas após liberação por hidrólise ou fermentação (MÖLLER et al., 2008).

O estudo das condições de hidrólise proporciona obter um hidrolisado específico, que é importante para o preparo de produtos com propriedades funcionais únicas e características benéficas relacionadas à saúde, sendo a ferramenta indispensável para identificar diferentes compostos bioativos (PACHECO et al., 2002).

Vários autores tem estudado os peptídeos obtidos através de hidrólise para diferentes finalidades, entre elas as atividades biológicas que os mesmos apresentam, como antioxidante (LI et al., 2007), antimicrobiana (BATTISON et al., 2008), anti-hipertensiva (SÁNCHEZ et al., 2011; SENTANDREU, TOLDRÁ, 2006), capacidade de absorção de cálcio (JUNG et al., 2006, JUNG, KIM, 2007), imunorreguladora (HUANG et al., 2010; KONG et al., 2008), entre outras.

O desenvolvimento microbiano é geralmente responsável pela deterioração de carnes e produtos à base de carne, em conjunto com as deteriorações bioquímicas e enzimáticas (DEVLIEGHERE; VERMEIREN; DEBEVERE, 2004) e as bactérias patogênicas

resistentes aos antibióticos tem se tornado um problema de saúde pública. Diante disso a importância de se obter proteínas ou peptídeos antimicrobianos (PAM), uma vez que esses são componentes essenciais do sistema imune inato, podendo apresentar uma atividade microbicida rápida e potente contra um amplo espectro de micro-organismos (REDDY, YEDERY, ARANHA, 2004).

Outra bioatividade de grande interesse é a atividade antioxidante, já que a oxidação é um processo vital em todos os organismos vivos, e seu efeito colateral é a produção de radicais livres (REN et al., 2008). As espécies reativas de oxigênio (ERO), tais como ânion superóxido ($\bullet O^{2-}$), radical hidroxila ($\bullet OH$) e peróxido de hidrogênio ($H_2O_2$) são normalmente produzidas nos organismos vivos durante o metabolismo (AHN, KIM, JE, 2014), e estão relacionadas com muitas doenças, tais como: a diabetes, hipertensão, doença cardiovascular aterosclerótica e câncer (MEMARPOOR-YAZDI, ASOODEH, CHAMANI, 2012). Uma das defesas mais eficazes contra várias doenças é a remoção de radicais livres e ERO, assim, o papel dos antioxidantes naturais tem recebido muita atenção (PENG, XIONG, KONG, 2009).

Diante do exposto, este trabalho vem a estudar a obtenção de fraçoes peptídicas com possíveis atividade antimicrobiana e antioxidante, obtidas através do processo de hidrolise enzimática de subprodutos gerados da industrialização da corvina.

# 2 OBJETIVOS

## 2.1 Objetivo geral

Produzir frações peptídicas com atividade antioxidante e antimicrobianas a partir de subprodutos da corvina (*Micropogonias furnieri*).

## 2.2 Objetivos específicos

Avaliar o uso do isolado proteico da carne mecanicamente separada de corvina como substrato para obtenção de peptídeos bioativos.

Avaliar o uso dos ossos desmineralizados de corvina como substrato para obtenção de peptídeos bioativos.

Avaliar o uso de diferentes enzimas proteolíticas comerciais no processo de hidrólise para obtenção de peptídeos bioativos;

Investigar a possível atividade antimicrobiana contra aos micro-organismos *Salmonella* Enteritidis e *Staphylococcus* coagulase positiva dos peptídeos obtidos pelo processo de hidrólise enzimática e a possível atividade antioxidante em cultura celular de hepatócitos de zebrafish dos peptídeos obtidos pelo processo de hidrólise enzimatica.

# 3 REVISÃO DA LITERATURA

## 3.1 Pescado

A produção mundial de pescado (proveniente tanto da pesca extrativa quanto da aquicultura) atingiu aproximadamente 146 milhões de toneladas em 2009 e 142 milhões de toneladas em 2008. O Brasil, neste contexto, contribuiu com 1.240.813 t em 2009, representando 0,86% da produção mundial de pescado. Em 2008, a produção de pescado nacional contribuiu com 0,81% do total produzido no mundo. Com este aumento no percentual de contribuição da produção total de pescado mundial de 2008 para 2009 (BRASIL, 2010).

A produção de pescado do Brasil, para o ano de 2010, foi de 1.264.765 t, registrando-se um incremento de 2% em relação a 2009, quando foram produzidas 1.240.813 t de pescado. A pesca extrativa marinha continuou sendo a principal fonte de produção de pescado nacional, sendo responsável por 536.455 t (42,4% do total de pescado), seguida, sucessivamente, pela aquicultura continental (394.340 t; 31,2%), pesca extrativa continental (248.911 t; 19,7%) e aquicultura marinha (85.057 t; 6,7%). O Rio Grande do Sul apresentou um incremento na produção de pescado em 2010 em relação ao ano de 2009, com um crescimento de 24,5%. O Consumo Per Capita Aparente de Pescado no país em 2010 foi de 9,75 Kg/hab./ano, com crescimento de 8% em relação ao ano anterior. Desse total, 66% do pescado consumido é produzido no Brasil (BRASIL, 2010).

O rendimento em filé de um pescado depende do peso corporal, sexo, composição corporal (gordura visceral), características anatômicas (relação cabeça/corpo), grau de mecanização na filetagem, método de filetagem e destreza do operador (LEONHARDT et al., 2006). Os estudos de carcaça de peixes têm grande importância do ponto de vista econômico e de produção, pois, através destes, pode-se fazer uma estimativa de produtividade, tanto para o piscicultor como para a indústria de processamento de pescado. (SOUZA; MARANHÃO, 2001). Gonçalves; Passos (2003) encontraram valores para o rendimento do filé de corvina de 32% e 36% respectivamente.

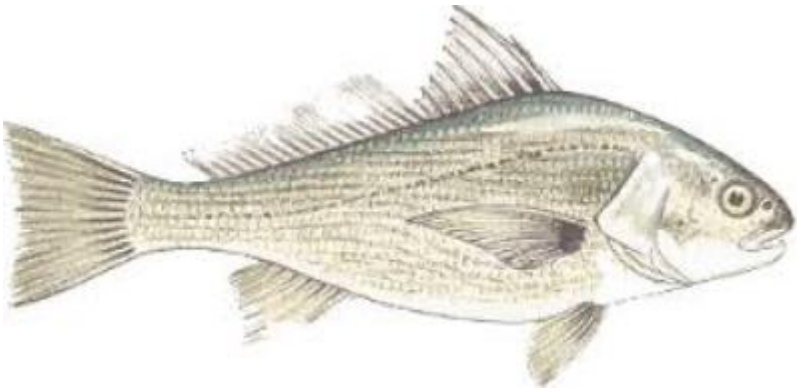
O termo resíduo refere-se às sobras e aos subprodutos do processamento dos alimentos que são de valor relativamente baixo. Caracteriza-se a cabeça, pele, escamas, vísceras e ossos (RAI et al., 2010).

Os ossos de pescado representam aproximadamente 15% da massa do mesmo e contêm colágeno e sais minerais (basicamente fosfato e carbonato de cálcio). É possível obter

esse colágeno após um processo de desmineralização (SKIERKA; DOWSKA; KARWOWSKA, 2007).

A corvina (*Micropogonias furnieri*), apresentada na Figura 1, pertencente à família das Sciaenidae podendo atingir até 70 cm de comprimento (ELSDON; GILLANDERS, 2002), é considerada, devido a sua abundância, uma das mais tradicionais e importantes espécies da pesca brasileira, argentina e uruguaia (BORGES et al., 2007). Na análise da produção pesqueira marinha por espécie, a segunda espécie mais capturada em 2010 foi a corvina, com 43.191 t (BRASIL, 2010). A corvina é considerada a primeira espécie em importância, sendo capturada por arrasteiros de fundo nas quatro estações do ano (VIEIRA; HAIMOVICI, 1993).

**Figura 1**: Corvina (*Micropogonias furnieri*)



Fonte: ambientes.ambientebrasil.com.br

A composição proximal da corvina varia em função das estações do ano, apresentando oscilações de 77,2 a 83,8% para umidade, 14,5 a 20,7% para proteína, 0,8 a 1 % para gordura e 1 a 1,2% para cinzas (BADOLATO et al., 1994).

## 3.2 Proteínas de origem animal

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

O pescado é constituído por vários grupos de proteínas: as proteínas sarcoplasmáticas tem a propriedade de serem solúveis em água e em soluções salinas diluídas,

compreendem as proteínas integrantes do líquido extracelular e as presentes nas pequenas partículas do sarcoplasma, abrangem 30% do total das proteínas do músculo do pescado. As proteínas miofibrilares abrangem de 40 a 60% do total proteico, são basicamente a miosina e a actina. Além dessas, outras proteínas participam da estrutura das miofibrilas e das interações com as proteínas contráteis, compreendendo 10%, como a tropomiosina e a troponina. As proteínas do estroma são o colágeno e a elastina, e consistem no resíduo da extração das proteínas sarcoplasmáticas e miofibrilares (OETTERER; REGITANO-D'ARCE; SPOTO, 2006).

As proteínas são hetero-polímeros complexos, formados por unidades de 20 aminoácidos essenciais unidos por ligações peptídicas, formando as cadeias peptídicas. A interação desses polipeptídeos formam as estruturas secundarias, terciarias e quaternárias. A estrutura primária é formada pela sequência de resíduos de aminoácidos, a estrutura secundária refere-se ao enrolamento e dobramento da cadeia, este enrolamento é devido às ligações de hidrogênio entre o grupo carbonila de um aminoácido e o grupo amino de outro, a estrutura terciaria e quaternária são determinadas por interações intermoleculares tais como: interações hidrofóbicas, interações iônicas, pontes de hidrogênio e pontes de dissulfeto (BERG, 2009).

A digestão das proteínas começa no estômago e continua na fase do lúmen do intestino delgado, o que resulta em uma mistura de oligopéptidos e aminoácidos livres. O metabolismo de peptídeos também pode ocorrer na borda em escova intestinal devido à ação das atividades de aminopeptidase e carboxipeptidase, resultando em uma mistura que consiste em grande parte dos aminoácidos livres, bem como di-e tri peptídeos (PHELAN et al., 2009). As enzimas que são capazes de quebrar ligações peptidicas são denominadas de proteases (ROMERO et al., 2001).

A molécula de colágeno (tropocolágeno) é uma estrutura composta por três cadeias de polipeptídeos, que se entrelaçam em torno de uma estrutura de tripla hélice estabilizada por ligações de hidrogênio (NORLAND, 1990 appud ALFARO et al., 2010), e pode ser isolado a partir da pele, ossos, espinhas e barbatanas (ORDÓÑEZ, 2005). As proteínas do tecido conjuntivo (colágeno, elastina e reticulina) constituem as fibras extracelulares que, por sua vez fazem parte do tecido conectivo típico que recobre as fibras e os feixes musculares. Os tecidos ricos em colágeno compreendem ossos, cartilagens, tendões e pele. O colágeno é definido como uma proteína que possui um ou mais domínios característicos com conformação tripla helicoidal repetitiva de aminoácídos Gly-X-Y (onde X é frequentemente prolina e Y hidroxiprolina). A molécula de colágeno é formada pelo

entrelaçamento em tríplice hélice de três cadeias polipeptídicas chamadas cadeias alfa. Essa estrutura protéica justifica as propriedades físicas e biológicas do colágeno, sendo elas rigidez e estabilidade (GUIMARÃES; ADELL; FELÍCIO, 1995).

### 3.3 Isolado proteico

Os isolados proteicos de diversas matérias-primas são constituídos principalmente por proteínas e apresenta baixos teores de gorduras/óleos e carboidratos (PAPALEO, 2004). O isolado proteico de soja é o mais produzido e utilizado comercialmente, no entanto as matérias-primas para obtenção de isolados proteicos podem ser as mais variadas, sendo a maioria destes isolados produzida a partir de resíduos da indústria de alimentos (SOUZA et al., 2000; COSTA et al., 2007; FONTANARI et al., 2007; ZIEGLER; SGARBIERI, 2009).

Em pHs menores ou maiores que o ponto isoelétrico as proteínas tornam-se carregadas, positiva ou negativamente, respectivamente. Deste modo, aumenta a repulsão eletrostática entre as moléculas proteicas e a hidratação dos resíduos carregados, aumentando assim a solubilidade proteica (YONGSAWATDIGUL; PARK, 2004). O ponto isoelétrico é o pH onde as cargas positivas e negativas se equivalem, ou seja, quando as moléculas não possuem cargas positivas nem negativas em excesso. O pH em que isso ocorre depende dos pKs dos grupos ionizáveis e será mais alto quanto mais resíduos básicos houver e mais baixo quanto mais resíduos ácidos presentes, sendo que a maioria das proteínas apresenta ponto isoelétrico na faixa de 4,5 a 6,5 (SGARBIERI, 1996).

Em geral, a solubilização/precipitação no ponto isoelétrico exige cinco passos: 1. Homogeneização, 2. Solubilização da proteína, 3. Remoção de materiais insolúveis e de lípidos a partir da solução proteica geralmente realizada por centrifugação, 4. Solução de proteína é precipitada no ponto isoelétrico e 5. Remoção de água da proteína precipitada normalmente realizado por centrifugação (TASKAYA; JACZYNSKI, 2009).

A produção de proteína obtida durante o processo por mudança de pH (conhecido como *pH shifting process*) é determinada por três fatores principais, a solubilidade das proteínas em condições extremas de pH, o tamanho do sedimento insolúvel formado durante o processo de centrifugação e a solubilidade das proteínas ao pH selecionado para a precipitação (NOLSØE; UNDELAND, 2009).

Muitos fatores interferem na extrabilidade da proteína (qualidade da matéria-prima, relação sólido/liquido, pH, temperatura, velocidade de centrifugação e força iônica),

contudo a máxima recuperação durante o processo de extração é de vital importância para determinar a quantidade de proteína no isolado (KALN et al., 2009). A recuperação de proteinas em isolados proteicos e relatada na literatura em teores entre 42 e 90% (NOLSØE; UNDELAND, 2009; TASKAYA; CHEN; JACZYNSKI, 2009).

No processo de hidrólise ácida, a propriedade funcional do produto final é a alta solubilidade. Utiliza-se neste processo ácido clorídrico ou sulfúrico, em alguns casos, altas temperaturas e altas pressões para promover a hidrólise ácida das proteínas, sendo necessária uma posterior neutralização, elevação do pH para 6 ou 7. Após procede-se uma concentração, onde forma-se uma pasta, ou simplesmente uma secagem (THAKAR; PATEL; JOSHI, 1991).

O processo de hidrólise alcalina pode resultar em baixa funcionalidade, e também afetar negativamente o valor nutritivo, do produto final. O hidróxido de sódio é utilizado (KRISTINSSON; RASCO, 2000) frequentemente em temperaturas elevadas (SATHIVEL, 2003), porém segundo Takeiti (2002), temperaturas acima de 60 ˚C não são aconselhadas por causarem desnaturação proteica.

### 3.4 Processo de hidrólise enzimática

As proteínas podem ser modificadas intencionalmente por reações químicas, transformações físicas, alterações genéticas ou pela utilização de enzimas. As técnicas envolvendo modificações químicas das proteínas têm dado lugar aos métodos enzimáticos pelo fato das reações hidrolíticas ácida e alcalina serem inespecíficas e destruírem aminoácidos como o triptofano, o que compromete o seu valor nutricional (SGARBIERI, 1996).

Os peptídeos presentes nos hidrolisados proteicos digeridos enzimaticamente têm mostrado diferentes propriedades físico-químicas e atividades biológicas que dependem de sua sequência de aminoácidos e de sua massa molecular. Sabe-se que a massa molecular dos fragmentos de peptídeos é um dos fatores chave para sua atividade biológica e para o desenvolvimento de métodos de separação desses peptídeos (SARMADI; ISMAIL, 2010).

A hidrólise proteica de pescado usando enzimas proteolíticas selecionadas possibilita o controle do grau de clivagem das proteínas no substrato. A utilização de proporções adequadas de enzima/substrato e tempos de reação permitem a produção de hidrolisados com diferentes estruturas moleculares e diferentes propriedades funcionais que podem encontrar aplicações em várias formulações alimentícias (ONODENALORE; SHAHIDI, 1996 apud SANTOS et al., 2009).

Entre os diferentes parâmetros bioquímicos, o grau de hidrólise (GH) é uma das características mais importantes, uma vez que o tamanho do peptídeo influencia diretamente nas suas propriedades nutricionais, funcionais e sensoriais (THIANSILAKUL; BENJAKUL; SHAHIDI, 2007). O grau de hidrólise (GH) é uma medida do grau de clivagem de ligações peptídicas. Proteínas intactas tem um valor GH de 0%, e uma proteína que foi completamente hidrolisada para aminoácidos livres tem um valor de 100%. O GH é determinado pelas condições do processo (relação enzima:substrato, tempo, temperatura e pH) e influenciado pela natureza da atividade enzimática (PANYAM; KILARA, 1996).

Os peptídeos que estão inativos dentro de proteínas, mostam efeitos fisiológicos no organismo e quando liberados apresentam função como compostos reguladores com a atividade hormonal-like (HARTMANN, MEISEL 2007). Esses peptídeos foram nomeados peptídeos bioativos (TANAKA et al., 2006). O tipo de peptídeos bioativos gerados a partir de uma determinada proteína é dependente de dois fatores: a sequência primária da proteina do substrato e a especificidade da enzima utilizada para gerar tais peptídeos (HARNEDY; FITZGERALD, 2012).

Existem enzimas proteolíticas classificadas como endo e exopeptidases. As Endopeptidases hidrolisam as ligações peptidicas nas moléculas de proteína de forma aleatória para produzir peptídeos relativamente grandes. Exoproteases sistematicamente removem os aminoácidos do N-terminal ou no C-terminal ou por hidrólise de peptídeos nas ligações terminais (CLEMENTE, 2000).

A Alcalase é uma enzima produzida por fermentação submersa do micro-organismo *Bacillus licheniformis* e foi desenvolvida pela Novo Nordisk (Bagsvaerd, Denmark) para a indústria de detergentes. Apresenta ótima atividade em pH 8,0 e temperatura de 50 °C (JUNG et al., 2006).

A Flavourzyme é uma protease fúngica complexa produzida pela fermentação submersa de uma linhagem selecionada de *Aspergillus oryzae* que não foi geneticamente modificada, atuando na hidrólise sob condições neutras ou ligeiramente ácidas (SLIZYTE et al., 2005). Atua melhor em pH 7,0 e temperatura de 50 °C (JUNG et al., 2006). A hidrólise resulta na liberação de aminoácidos N-terminal de ordem sequencial Xaa+, Yaa-, onde Xaa representa o primeiro aminoácido hidrolisado e é preferencialmente leucina, mas pode ser outros, incluindo prolina. Yaa representa o segundo aminoácido hidrolisado e pode ser prolina (HAMMERSHØJ; NEBEL; CARSTENS, 2008).

A Protamex (mistura de endo e exopeptidases) é uma preparação bacteriana do *Bacillus sp*. É utilizada na indústria de alimentos para melhorar as propriedades funcionais,

nutricionais e flavorizantes da proteína (NOVOZYMES, 2012). Tendo como condição ótima de atividade o pH 7,0 (JE et al., 2007); e a temperatura de 40 °C (JUNG et al., 2006).

### 3.5 Ultrafiltração

A partir das técnicas de separação por membrana podemos obter proteínas isoladas com melhor funcionalidade (BOYE et al, 2010). O processo de Ultrafiltração (UF) é muito simples e os requisitos de energia são muito baixos, não térmico e não altera o soluto e a concentração, o fracionamento e purificação podem ser efetuadas em simultâneo, por esta razão UF é considerando uma tecnologia limpa. E também por não requerer produtos químicos e compostos a serem adicionados (TORRES et al., 2002).

Os processos de separação por membrana (PSM) podem ser aplicados com grande vantagem na concentração, fracionamento e purificação das proteínas do soro. Dentre os PSM, o mais usado na recuperação de proteínas é a ultrafiltração (UF) operada em fluxo tangencial. A UF é um processo comandado por um gradiente de pressão através de uma membrana semipermeável para separar macromoléculas ou colóides de uma solução. Para o soro de leite, além da remoção de água, a ultrafiltração é capaz de reduzir o teor de sais e lactose desde que a membrana seja escolhida adequadamente (GHOSH, 2003 apud PEREIRA, 2009).

A distribuição da massa molar dos peptídeos solúveis é importante, pois fornecem informações sobre a possível utilização dos hidrolisados (THIANSILAKUL; BENJAKUL; SHAHIDI *et al*., 2007).

### 3.6 Peptídeos bioativos

De acordo com o “Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas”, uma substância bioativa é aquela onde, além dos nutrientes, os não nutrientes que possuem ação metabólica ou fisiológica específica, devem estar presente nas fontes alimentares. Ela pode ser de origem natural ou sintética, desde que comprovada sua segurança para consumo humano (BRASIL, 2002).

Os peptídeos bioativos estão inativos dentro da proteína inteira, mas podem ser liberados por hidrólise tanto durante a digestão gastrointestinal como pelo processamento do alimento, como em queijos ou leites fermentados. Normalmente contém de 2 a 20 resíduos de aminoácidos. Após a digestão, os peptídeos bioativos podem ser absorvidos através do

intestino, entrar na corrente sanguínea e exercer efeitos sistêmicos, ou ainda, produzir efeito local no trato gastrointestinal (ERDMANN; CHEUNG; SCHRÖDER, 2008). Diferentes efeitos sobre a saúde têm sido atribuídos a alimentos derivados de peptídeos, que dependem da sequência de aminoácidos (MEISEL, 2004).

Proteínas e peptídeos bioativos são obtidos de fontes animais como: sangue bovino, gelatina, carne, ovos e diversas espécies de pescado (atum, sardinha, arenque e salmão entre outros) e vegetais como: trigo, milho, soja, arroz, cogumelos, abóbora e sorgo, em geral, proteínas bioativas tem sido diretamente detectadas após liberação por hidrólise (MÖLLER et al., 2008).

Muitos dos peptídeos bioativos conhecidos são multifuncionais e podem exercer mais de um dos efeitos. Devido ao seu potencial reforço para saúde e perfil de segurança eles podem ser utilizados como componentes em alimentos funcionais ou nutracêuticos (ERDMANN; CHEUNG; SCHRÖDER, 2008).

Vários autores vêm estudando as propriedades boativas de diversos peptídeos, assim, Huang; Ren; Jiang (2010) verificaram que o peptídeo purificado apresentou atividade de ligação ao cálcio de 2,70 mmol/g de proteína e sua estrutura foi identificada como Thr-Cys-His. Este peptídeo foi obtido pela hidrólise com Tripsina do subprodutos de processamento de camarão. Su et al. (2012) examinaram a interacção do peptídeo trichokonin VI, um peptaibol isolado a partir de *Trichoderma pseudokoningii*, contra a bactéria *Bacillus subtilis*, uma bactéria gram-positiva e verificaram qu o trichokonin VI foi eficaz contra *B. subtilis* com uma concentração inibitória mínima de 25 µM. Sánchez et al. (2011) estudaram o efeito da ingestão a longo prazo de um produto à base de caseína hidrolisada do leite de caseína, no desenvolvimento da hipertensão em ratos espontaneamente hipertensos (RSH), e concluiram que o desenvolvimento da hipertensão foi atenuada no grupo tratado com o produto hidrolisado de caseína, e neste sentido houve um aumento da pressão arterial sistólica de 33 ± 3 mmHg no grupo controle e apenas 18 ± 5 mmHg no grupo tratado durante o período experimental. Pihlanto; Akkanen; Korhonen (2008) Isolaram proteínas a partir de tubérculos de batata (*Solanum tuberosum*), em diferentes estados fisiológicos, e os subprodutos da indústria da batata foram utilizados para avaliar as suas potências de inibição da Enzima conversora de angiotensina (ECA). A Proteína isola e os subprodutos foram autolisado ou hidrolisado por Alcalase, Neutrase e Esperase. A hidrólise aumentou a inibição da ECA. As potências de inibição da ACE de hidrolisados foram elevadas ($IC_{50}$ = 0,018-0,086) e as frações dos subprodutos mostraram inibição da ECA também antes da hidrólise.

### 3.7 Atividade antioxidante

Os antioxidantes podem ser definidos como um conjunto heterogêneo de substâncias formadas por vitaminas, minerais, pigmentos naturais e outros compostos vegetais e, ainda, enzimas, que bloqueiam o efeito danoso dos radicais livres (BIANCHI; ANTUNES, 1999). Eles podem ser sintéticos ou naturais e, para serem utilizados em alimentos, fármacos ou como suplementos nutricionais devem ser seguros para a saúde. Alguns dos antioxidantes sintéticos mais importantes são hidroxianisol de butila (BHA) e o hidroxitolueno de butila (BHT) e entre os naturais destacam-se o ácido ascórbico, o α-tocoferol e o β-caroteno (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006; JE et al., 2009).

No entanto, quando um excesso de radicais livres é formado, o sistema de proteção antioxidante enzimática inerente do organismo pode tornar-se dominado o que pode causar efeitos celulares destrutivos e letais por oxidação de lípidos, proteínas, ácido desoxirribonucleico (ADN) e enzimas (PIHLANTO, 2006).

O estresse oxidativo tem sido associado ao desenvolvimento de muitas doenças crônicas e degenerativas, incluindo o câncer, doenças cardíacas, doenças degenerativas como Alzheimer, além de estar envolvido no processo de envelhecimento. O desequilibrio entre o estresse oxidativo e as funções antioxidantes dos organismos vivos parece ter um papel na carcinogênese. Desde então, o interesse nesta área levou pesquisadores a buscarem peptídeos antioxidativos a partir de diversas proteínas (ROESLER et al., 2007).

Os radicais livres surgem naturalmente durante o metabolismo e durante respiração em organismos aeróbios, sendo subprodutos de reações normais, tais como a degradação dos lípidos e a resposta de catecolamina devido ao estresse e a processos inflamatórios (WANG et al., 2008). Durante as reações normais do corpo, tais como respiração, são formadas espécies reativas de oxigênio (ERO), tais como: ânion superóxido ($^{\bullet}O_2^-$), radicais hidroxila ($^{\bullet}OH$), e espécies não radicalares como o peróxido de hidrogênio ($H_2O_2$) e oxigênio singlete ($^1O_2$) (GÜLÇIN, 2010).

Espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) têm importante função biológica, como na fagocitose, fenômeno em que essas espécies são produzidas para eliminar o agente agressor. Por outro lado, quando sua produção é exacerbada, o organismo dispõe de um eficiente sistema antioxidante que consegue controlar e restabelecer o equilíbrio. O sistema antioxidante é classificado em enzimático e não enzimático. O enzimático é representado, principalmente, pelas enzimas antioxidantes: a superóxido dismutase (SOD) que catalisa a dismutação do ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet}$) a

peróxido de hidrogênio ($H_2O_2$) e $O_2$, a catalase (CAT) que atua na decomposição de $H_2O_2$ a $O_2$ e $H_2O$ e a glutationa peroxidase (GPx), que atua sobre peróxidos em geral, com utilização de glutationa como co-fator (VASCONCELOS et al., 2007). A glutationa é o principal antioxidante produzido pela célula, sendo esta a sua função principal, protegendo-a de radicais livres (LOMAESTRO; MALONE, 1995).

A glutationa interfere na catálise, metabolismo e transporte; participa em reações que envolvem a síntese de proteína e ácidos nucleicos e também em reações de metabolização de peróxido e de inativação de radicais livres. É frequente a formação de conjugados de glutationa com uma grande variedade de compostos de origem endógena e exógena podendo a glutationa ser também um co-factor para diversas enzimas (NETO, 2010).

Pode-se considerar que o efeito protetor, tanto das proteínas hidrolisadas como dos peptídeos do soro de leite provavelmente, está correlacionado com a elevada concentração de aminoácidos sulfurados presentes nas amostras, os quais são considerados limitantes na síntese da glutationa (PACHECO et al., 2006).

A glutationa é um tripeptídeo composto de glutamato, glicina e cisteína. Está distribuída em todos os tecidos do organismo humano e produz vários efeitos biológicos, como: estímulo à síntese de IGF-1 (*Insulin Growth Factor* 1), aumento do sistema imunológico, ação hipocolesterolêmica e antitumoral e retardo do envelhecimento em animais de laboratório (PACHECO et al., 2005).

Para que melhor se possa proteger, a própria célula tem estratégias de combate à agressão por parte dos ERO, nomeadamente organelos, como mitocôndria e núcleo, que tem a sua própria reserva de glutationa reduzida (GSH), protegendo individualmente estas estruturas contra a ação destas espécies. Esta proteção é crucial, pois a alteração do estado redox intracelular pode implicar processos pré-mutagenicos no ADN (LU, 2009).

A GSH tem um papel importante no armazenamento e transporte de cisteína, na defesa celular contra radicais livres, peróxidos e xenobióticos, atuando em conjunto com as enzimas glutationa peroxidase (GPx) e glutationa-S-transferase (GST). Além destas funções, a GSH também participa na modulação da transdução de sinal, regulação da proliferação celular, regulação imune (SIES, 1999), metabolismo de leucotrienos e prostaglandinas, entre outras (FORMAN; RINNA; ZHANG, 2009).

Existem vários métodos "*in vitro*" e "*in vivo*" para analisar a atividade antioxidante, de substâncias biologicamente ativas. Entre os métodos "*in vitro*" pode se destacar: método de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) (RUFINO et al.,

2007), método de sequestro do radical hidroxila (OH•) (SARMA; SHARMA, 1999), método de sequestro do radical 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS+) (RE et al., 1999), inibição da peroxidação lipídica (NASCIMENTO; ARAÚJO; MELO, 2010) e poder redutor (SUN; TANUMIHARDJO, 2007).

Um método "*in vivo*" que avalie a atividade antioxidante pode ser realizado com células de hepatócitos de zebrafish (ZF), que é um pequeno peixe teleósteo (3 a 4 cm), da espécie *Danio rerio*. As principais justificativas para o uso deste peixe é devido a ele ser de pequeno porte, de manutenção fácil, econômicos para criação, com alta taxa reprodutiva, com seu genoma sequenciado e apresentar importante homologia com os mamíferos. Constituem excelente modelo experimental para estudos comportamentais, genéticos, toxicológicos e para desvendar o mecanismo de diversas doenças humanas bem como testar novos agentes terapêuticos ( LIESCHKE; CURRIE, 2007; KARI; RODECK;  DICKER, 2007).

### 3.8 Atividade antimicrobiana

O desenvolvimento microbiano é geralmente responsável pela deterioração de carnes e produtos à base de carne, em conjunto com as deteriorações bioquímicas e enzimáticas (DEVLIEGHERE; VERMEIREN; DEBEVERE, 2004).

As bactérias patogênicas resistentes aos antibióticos se tornam um problema de saúde pública, portanto é importante que novos antibióticos continuem a ser desenvolvidos (GIULIANI; PIRRI; NICOLETTO, 2007). Produtos naturais são uma fonte valiosa e fundamental para a descoberta de novos medicamentos. Entre os potenciais candidatos, os peptídeos antimicrobianos (PMAs) têm atraído recentemente crescente interesse, e têm sido propostos como uma alternativa promissora aos antibióticos convencionais (PETERS; SHIRTLIFF; JABRA-RIZK, 2010).

Peptídeos endógenos, que são constitutivamente expressos ou induzidos por infecção, proveem um rápido e efetivo meio de defesa contra patógenos (REDDY; YEDERY; ARANHA, 2004). Esse grupo de moléculas chamados de peptídeos antimicrobianos (PAMs) constitui um mecanismo de defesa primitivo, e são encontrados desde os organismos simples, como bactérias, até nos organismos mais complexos, como animais, incluindo os humanos (OSTBERG et al., 2005) e representam uma família de antibióticos que têm estimulado a investigação e interesse clínico (WU et al., 1999). Enquanto a maioria dos antibióticos convencionais não age contra fungos e as drogas que matam fungos não são ativas contra as

bactérias, peptaibols e outros PAM têm excelente atividade contra patógenos tanto bacterianos quanto fúngicos (HANCOCK, 2001). Peptaibols são um grupo de pequenos peptídeos que contém alto conteúdo do ácido α-aminoisobutírico (Aib) que é um antibiótico importante devido as suas propriedades antimicrobianas e anticâncer, é produzido por fungos filamentosos, especialmente pelos membros do género *Trichoderma* (MUKHERJEE et al., 2011).

Os peptídeos antimicrobianos são pequenos, com carga positiva e molécula anfipática (aquelas que possuem tanto regiões hidrofóbicas quanto hidrofílicas) sua composição de aminoácidos, e o comprimento variam de 6 a 100 resíduos de aminoácidos (GIULIANI; PIRRI; NICOLETTO, 2007).

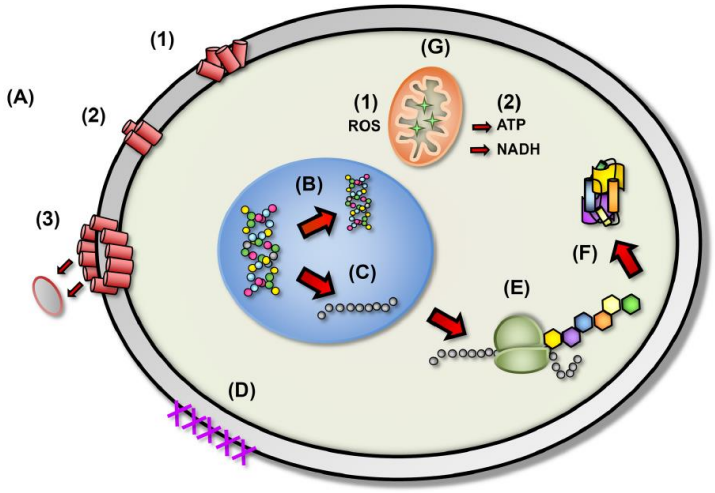
O mecanismo molecular e a via de permeação da membrana podem variar para diferentes peptídeos de acordo com diferentes parâmetros, tais como: a sequência de aminoácidos, a composição da membrana lipídica, e a concentração de peptídeo (ZASLOFF, 2002).

Embora os mecanismos pelos quais os peptídeos se associam e permeabilizam pela membrana das células microbianas não são totalmente claros, é proposto que os PAMs se ligam a membrana citoplasmática criando micelas agregadas semelhantes, conduzindo a um efeito de ruptura, resultando na lise celular (YEAMAN; YOUNT, 2003; HANCOCK, 2003).

Peptídeos antimicrobianos catiônicos (cPAM) tem grande afinidade pelos fosfolipídios ou por lipopolissacarídeos de membrana, substituindo os íons $Ca^{2+}$ e $Mg^{2+}$ (HANCOCK; CHAPPLE, 1999). Os PAM ainda podem se ligar a um receptor da membrana, levando a uma perda específica de sua função, ao se translocarem através da membrana. Ainda essas moléculas podem atuar intracelularmente (TOSSI; SANDRI; GIANGASPERO, 2000), inibindo a biossíntese da parede celular, do ácido desoxirribonucleico (ADN), ácido ribonucleico (ARN), e a síntese de proteínas (PETERS; SHIRTLIFF; JABRA-RIZK, 2010).

A Figura 2 apresenta os diversos mecanismos de ação propostos para a atividade dos peptídeos antimicrobianos em células microbianas.

**Figura 2**: Mecanismo de ação proposto para peptídeos antimicrobianos: (A) Ruptura da membrana celular: (1) inserção aleatória dentro da membrana, (2) alinhamento de sequências hidrofóbicas, e (3) remoção de secções da membrana e formação de poros. (B) Inibição da síntese de ADN. (C) Bloqueio da síntese de ARN. (D) Inibição de enzimas necessárias para a ligação de proteínas estruturais da parede celular. (E) Inibição da função do ribossoma e a síntese de proteínas. (F) Bloqueio de proteínas chaperonas necessárias para o enrolamento adequado das proteínas. (G) Segmentação das mitocôndrias: (1) inibição da respiração celular e a indução da formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e (2) ruptura da integridade da membrana celular mitocondrial e efluxo de ATP e NADH (PETERS; SHIRTLIFF; JABRA-RIZK, 2010).




Os peptídeos catiônicos antimicrobianos (cPAM) têm atraído atenção como alternativa ao uso de antibióticos, devido à seu amplo espectro de atividades contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, vírus, fungos (YEUNG; GELLATLY; HANCOCK, 2011).

A eficiência "*in vitro*" e "*in vivo*" dos peptídeos dendrímeros tais como os PAM é geralmente atribuída a sua natureza multimérica, que permite interações polivalentes, em ciências médicas. Os dendrímeros são ferramentas úteis em várias aplicações como imitadores de anticorpos, vetores de transporte de drogas, agentes anticancerígenos, ressonância magnética e reagentes de contraste (LEE et al., 2005).

Devido às propriedades, juntamente com a ampla gama de atividade e o curto tempo de contato necessário para induzir morte, levaram a considerar os PAM como excelentes candidatos para o desenvolvimento como novos agentes terapêuticos (PETERS; SHIRTLIFF; JABRA-RIZK, 2010). Desse modo começaram a explorar a possibilidade dos

peptídeos antimicrobianos serem gerados durante a digestão de proteínas de alimentos no trato gastrointestinal por proteases presentes nestes órgãos. A maior parte dos peptídeos antimicrobianos derivados das proteinas dos alimentos era obtida a partir da digestão proteolítica das proteínas do leite, mas outras proteínas alimentares tem o potencial para produzir peptídeos antimicrobianos no organismo (IBRAHIM; SUGIMOTO; AOKI, 2000). Yang et al. (2013) avaliaram a atividade antimicrobiana de peptídeos obtidos a partir de pele de rã (*Hylarana spinulosa*), Seo et al. (2014) encontraram atividade antimicrobiana de peptídeos extraídos de pele de pescado (*Katsuwonus pelamis*) e Ting et al. (2014) estudaram o mecanismo de ação de peptidos antimicrobianos obtidos do pescado *Pardachirus marmoratus*.

### 3.9 *Salmonella* Enteritidis e *Staphylococcus* coagulase positiva

O gênero *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae* e compreendem bacilos Gram-negativos não produtores de esporos. São anaeróbios facultativos, produzem gás a partir de glicose e são capazes de utilizar o citrato com única fonte de carbono. O pH ótimo para a multiplicação das salmonelas fica próximo de 7,0, sendo que valores superiores a 9,0 e inferiores a 4,0 são bactericidas. Não toleram concentrações de sal superior a 9%. O nitrito é inibitório e seu efeito é acentuado pelo pH ácido. A temperatura ideal para multiplicação é de 35 a 37 °C, sendo a mínima de 5 °C e a máxima de 47 °C. Seu principal reservatório é o trato gastrointestinal do homem e de animais, principalmente aves e suínos. (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Estruturalmente, as paredes celulares de Gram negativas contêm duas camadas externas à membrana citoplasmática. Imediatamente externa à membrana celular há uma fina camada de peptidoglicanos que contribui somente para 5 a 10% do peso da parede celular da bactéria Gram negativa. As membranas externas são peculiares às bactérias Gram negativas, ela mantém a estrutura bacteriana, sendo uma barreira de permeabilidade às grandes moléculas e a moléculas hidrofóbicas. A membrana externa está conectada à membrana citoplasmáica em sítio de aderência e é ligada ao peptidoglicano por lipoproteínas. O peptidoglicano é um emaranhado rígido construído a partir de cadeias lineares de polissacarídeos semelhantes a cordas ligadas cruzadamente por peptídeos (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009).

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são cocos Gram-positivos pertencentes à família *Micrococcaccae* por dividirem-se em planos diferentes, quando vistos em microscópio

aparecem na forma de cacho de uva. São facultativas anaeróbias, com maior crescimento sob condições aeróbias, quando então produzem catalase. São bactérias mesófilas apresentando temperatura de crescimento na faixa de 7 a 47,8 °C, as enterotoxinas são produzidas entre 10 a 46°C, com ótimo entre 40 e 45 °C. Em condições ótimas, a enterotoxina torna-se evidente em 4 a 6 h e são tolerantes a concentrações de 10 a 20% de NaCl e a nitratos, o que torna os alimentos curados veículos potenciais para as mesmas (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Uma bactéria Gram positiva tem uma parede celular espessa em múltiplas camadas constituída principalmente de peptidoglicanos envolvendo a membrana citoplasmática. O peptidoglicano é um exoesqueleto emaranhado similar em função a um exoesqueleto de inseto, entretando, o peptidoglicano da célula é suficientemente poroso para pemitir a difusão de metabólitos para a membrana plasmática. O peptidoglicano é essencial para a estutura, para a duplicação e para a sobrevivência em condições normalmente hostis nas quais as bactérias crescem. A parede celular das bactérias Gram positivas pode incluir, também os ácidos teicoico e lipoteicoico e polissacarídeos complexos (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009).

### 3.10 Aplicação dos peptídeos bioativos

Os hidrolisados de proteína de alimentos podem ter uma grande variedade de aplicações, por exemplo, como agentes de fortificação de nitrogênio, em bebidas especializadas, como ingredientes pré-digestivos para nutrição enteral/parenteral em segmentos da população geral ou específica, em preparações de peptídeos isolados com função fisiológica benéfica, como ingredientes em cultura de células, meios de crescimento bacteriológico e como ingredientes em cosméticos e produtos de saúde. A hidrólise também resulta numa redução no potencial alergênico (FITZGERALD; MEISEL, 2003 apud FITZGERALD; O’CUINN, 2006).

As fórmulas hidrolisadas são úteis também na rápida recuperação pós-cirúrgica e no tratamento de pacientes que apresentam doenças ou condições clínicas e fisiológicas que prejudicam o funcionamento do sistema digestório, tais como: colite ulcerativa, fibrose cística, síndrome do intestino curto, fístulas, pancreatite, traumas severos e doença de Crohn (SCHMIDL; TAYLOR; NORDLEE, 1994). Também como alternativa para o tratamento de fenilcetonúria com hidrolisados protéicos isentos ou com baixo teor de fenilalanina (MIRA; MARQUEZ, 2000).

Segundo Chen; Li (2012), a fração de peptídeos derivados de caseína menor que 1 kDa com propriedades antioxidantes poderia ser um candidato promissor para suplementos dietéticos e produtos nutritivos.

# 4 MATERIAL E MÉTODOS

## 4.1 Matéria-prima

As matérias-primas utilizadas para produzir as frações peptidicas com possíveis atividades bioativas foram obtida a partir de subprodutos (carne mecanicamente separada e ossos) da industrialização da corvina, que foram fornecidos por uma indústria de processamento de pescado da cidade de Rio Grande, RS.

## 4.2 Infraestrutura

Tanto a parte analítica quanto a de processamento foram desenvolvidas principalmente no Laboratório de Tecnologia de Alimentos e na Unidade de Processamento de Pescado, localizados na Universidade Federal do Rio Grande (FURG), em Rio Grande/ RS. Também foram utilizados, outros laboratórios da Engenharia de Alimentos localizados no Campus Cidade da FURG e Laboratório de Ciências Biológicas localizado no Campus Carreiros da FURG.

## 4.3 Enzimas, Cultura celular e Reagentes

No processo de hidrólise foram utilizadas três enzimas proteolíticas: Alcalase (endopeptidase de *Bacillus licheniformis*), doada pela Novozymes Latin America, representante Tovani Benzaquem Rep. Ltda (Araucária, Brasil), Flavourzyme (mistura de endoprotease e exopeptidase de *Aspergillus oryzae*), doada pela Novozymes Latin America, representante Tovani Benzaquem Rep. Ltda (Araucária, Brasil) e enzima Protamex (mistura de endo e exopeptidase, de *Bacillus* sp.), obtida do pâncreas bovino, fornecida pela Sigma-Aldrich Co (St. Louis, MO, EUA).

As culturas de hepatócitos de zebrafish (estirpe ZFL) foram fornecidas pela American Type Culture Collection (ATCC), estas foram mantidas a 28 °C em meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico/antimicótico (Costa et al., 2012).

As membranas de ultrafiltração utilizadas no fracionamento foram adquiridas da empresa Millipore Industria e Comércio Ltda de São Paulo, Brasil.

Os demais reagentes foram de grau analítico (P.A.).

## 4.4 Micro-organismos

Os micro-organismos utilizados neste trabalho foram *Salmonella* Enteritidis e *Staphylococcus* coagulase positiva, cedidos pelo Laboratório de Microbiologia e Biosseparações da Universidade Federal do Rio Grande, RS.

## 4.5 Caracterização química das amostras

As análises da composição proximal química realizadas foram de umidade, proteínas, lipídeos e cinzas, de acordo com os procedimentos n° de 960,39; 992,15; 925,30 e 923,03, respectivamente, recomendadas pela AOAC (2000). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

## 4.6 Obtenção da carne mecanicamente separada de corvina

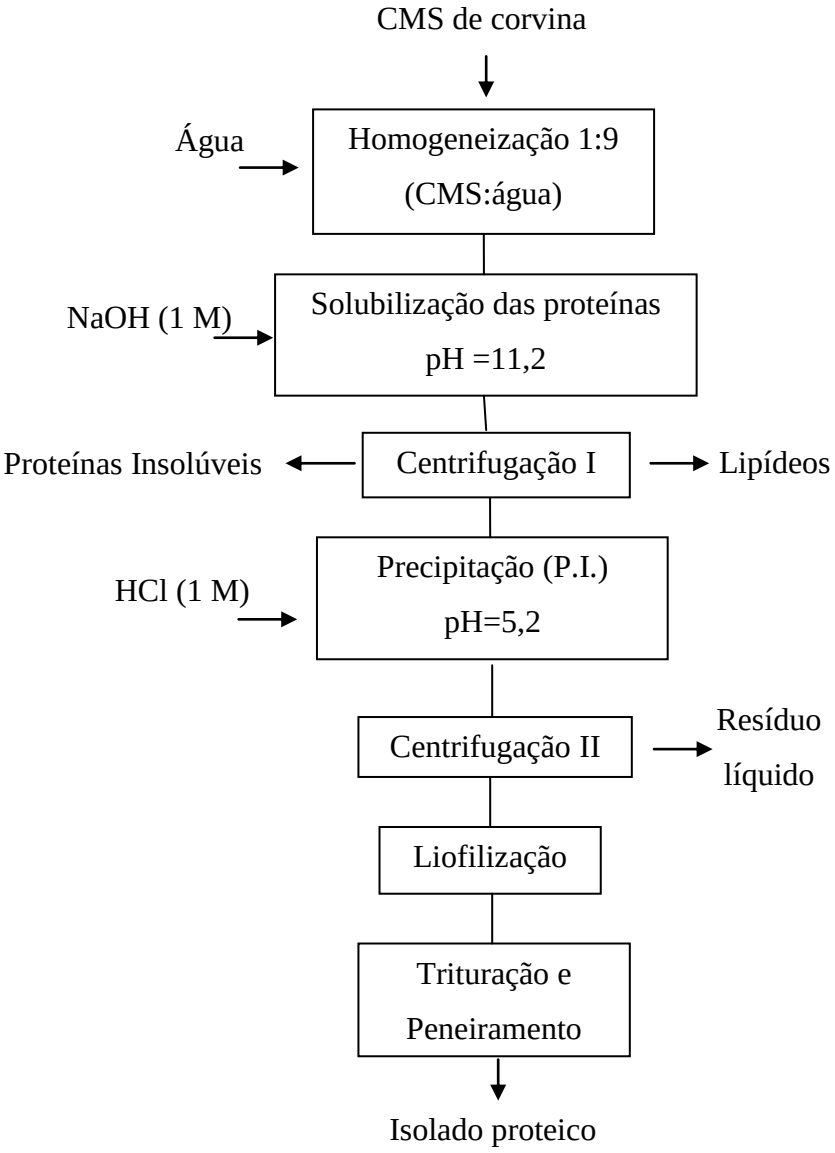
Para a obtenção da carne mecanicamente separada (CMS) foram utilizadas as carcaças da industrialização da corvina, cedida por uma indústria local; essas foram transportadas até a planta de processamento de pescado, onde foi lavado com água clorada (2 $g.L^{-1}$), esviscerados e separados em um separador mecânico de carnes e ossos (High Tech, HT 250C, Brasil), para retirada da pele e espinhos, obtendo desta forma a CMS.

As amostras de CMS foram acondicionadas e armazenadas a temperatura de -20 °C ± 2°C, a fim de evitar a deterioração das mesmas, até a sua utilização.

## 4.7 Obtenção do isolado proteico da corvina (IP)

A Figura 3 apresenta o fluxograma do processo de obtenção do isolado proteico obtido a partir da carne mecanicamente separada de corvina, utilizando processo de variação do pH (ou pH shifting process, proposto por Nolsøe; Undeland, 2009.).

**Figura 3:** Fluxograma do processo de obtenção de isolado proteico obtido a partir do subproduto da corvina, adaptado de Cortez-Vega (2011).




A obtenção do isolado proteico foi realizada segundo Cortez-Vega (2011), adaptado de Freitas (2012) utilizado a carne mecanicamente separada de corvina, essa foi homogeneizado com água destilada na proporção 1:9 (p:v) CMS:água, a temperatura de 2-3 °C controlada através de banho ultratermostático (QUIMIS, modelo 214 D2, Brasil), durante 5 min com agitador eixo-hélice (IKA, modelo RW 20DZM.n, Brasil). Após esse processo foi realizado a solubilização das proteínas em pH 11,2 com adição de NaOH 1 M, por 20 min, então as amostras foram centrifugadas a 7500 x g por 15 min em centrífuga de copos (SIGMA, modelo 6-15, Brasil) no intuito de separar os lipídios e as proteínas insolúveis

(precipitado) das proteínas solúveis (sobrenadante), no sobrenadante foi realizada a precipitação isoelétrica das proteínas solubilizadas em pH 5,2 com de adição HCl 1 M, por 20 min e então realizada a centrifugação (7500 x g por 15 min) para separar a fração insolúvel da fração solúvel, facilitando a coleta das proteínas precipitadas, então as amostras foram liofilizadas (EDWARDS, Brasil), trituradas em homogeneizador (TECNAL, modelo TE-645, Brasil) e peneiradas em peneiras de 100 mesh, então armazenados em freezer a – 18 °C ± 2 °C.

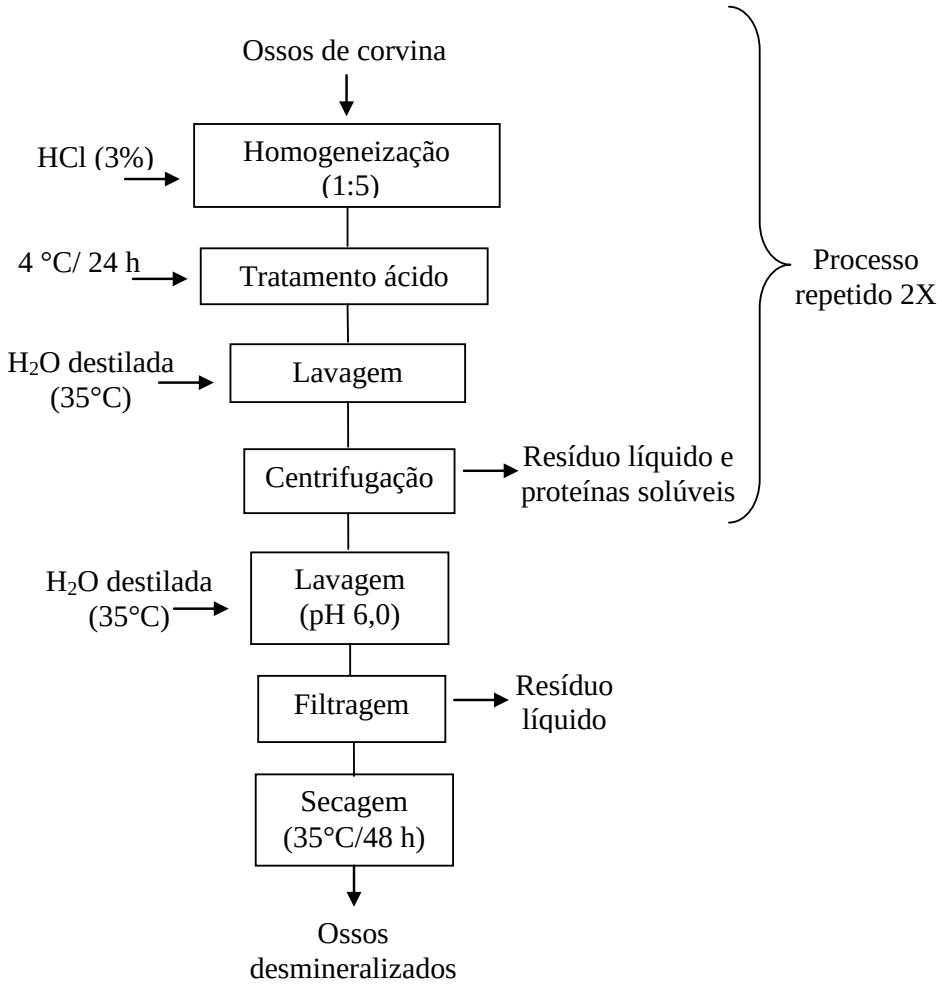
**4.8 Obtenção dos ossos de corvina**

Os ossos foram obtidos a partir da corvina, que foi cedida por uma indústria local, essa foi transportada até a planta de processamento de pescado. Logo foram separados da carne manualmente e deixados em solução de HCl 0,1 M por 24 h a 4 °C, para melhor retirada da carne aderida, após foram secos por 48 h em estufa (Quimis, 314D242, Brasil) a 35 °C e logo triturados em um moinho de facas (Thomas Scientific, modelo Wiley Mill, EUA). As amostras foram acondicionadas e armazenadas a temperatura de -20°C ± 2°C, a fim de evitar a deterioração dos mesmos, até a sua utilização.

**4.9 Processo de desmineralização dos ossos de corvina**

A Figura 4 apresenta o fluxograma do processo de desmineralização dos ossos da corvina, e remoção das proteínas não colagenosas (miofibrilares e sarcoplasmáticas).

**Figura 4**: Fluxograma do processo de desmineralização dos ossos de corvina e remoção de algumas proteínas não colagenosas.




A desmineralização dos ossos foi realizada segundo Alfaro et al. (2010), com algumas modificações. Os ossos foram misturados com uma solução de HCl 3% na proporção 1:5 ossos: HCl, homogeneizadas a 600 rpm em homogeneizador eixo-hélice (IKA®, modelo RW28, Staufen, Alemanha) por 5 min e mantidas a 4 °C por 24 h. As amostras foram então lavadas com $H_2O$ destilada a 35°C, a mistura foi centrifugada a 9000 x g (Biosystems, modelo MPW-350/350R, Brasil) por 20 min. Este processo foi repetido novamente. O material sedimentado foi lavado com $H_2O$ destilada a 35 °C até atingir pH 6,0, estes entao foram filtrados para retirado do excesso de água e secos em estufa (Quimis, 314D242, Brasil) à 35°C por 48 h, depois acondicionados à -20 ± 2 °C, para uso posterior.

## 4.10 Concentração de tirosina livre

A tirosina presente no hidrolisado foi determinada de acordo com metodologia da Sigma (1999), utilizando a curva padrão de tirosina (Apêndice 1).

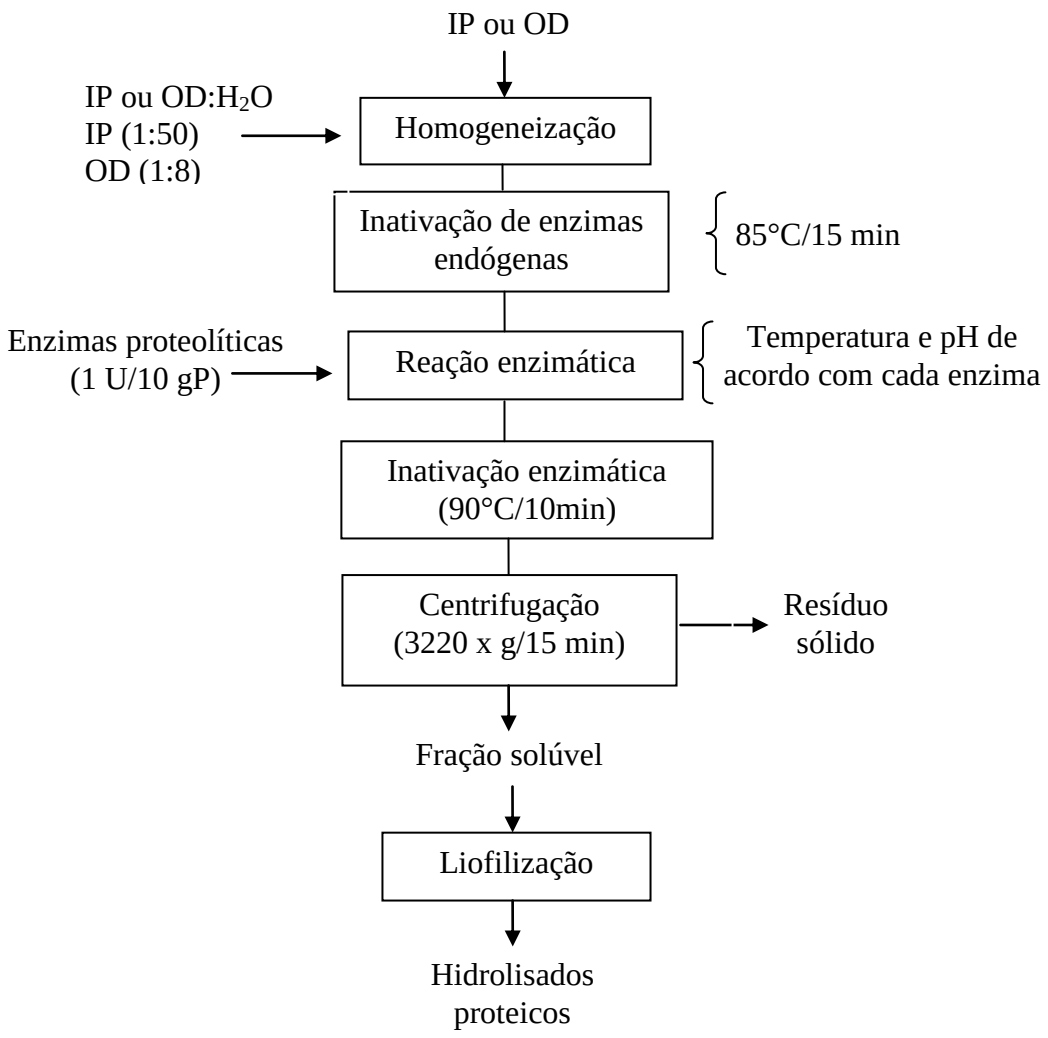
## 4.11 Atividade proteolítica específica

Antes do inicio do processo de hidrólise foi realizada a atividade específica de cada enzima, de acordo com metodologia para proteases descrita por Sigma (1999). A atividade enzimática foi definida como µmol de tirosina livre/min/mg de proteína. A proteína da enzima foi quantificada pelo método de Lowry, (1951), utilizando a curva padrão de albumina (Apêndice 2).

## 4.12 Hidrólise enzimática

A obtenção dos hidrolisados da corvina foi baseado no processo descrito por Kristinsson; Rasco (2000), utilizando a proporção enzima/substrato proteico de 1 U:10 g de proteina, de acordo com a atividade específica de cada enzima. A Figura 5 mostra o fluxograma geral do processo de hidrólise enzimática do isolado proteico dos subprodutos de corvina.

**Figura 5:** Fluxograma geral do processo de hidrólise enzimática do isolado proteico (IP) e dos ossos desmineralizados (OD) de corvina.




Antes do processo de hidrólise, as enzimas endógenas contidas na IP e nos OD foram inativadas em banho a 85 °C por 15 min. A reação de hidrólise se realizou em um reator de vidro, de parede dupla, conectado a um banho termostatizado (BROOKFIELD TC/102 – EUA), utilizando as 3 enzimas em separado de acordo com as condições ótimas de cada uma: Alcalase (pH 8,0; 50 °C), Flavourzyme (pH 7,0; 50 °C) e Protamex (pH 7,0 (JE et al., 2007); 40 °C) (JUNG *et al*., 2006). A proporção enzima e substrato proteico foi de 1:10$_{(U/g\ de\ proteína)}$ segundo a atividade específica de cada enzima (Alcalase 99,75 U/g, Flavourzyme 2,07 U/g e Protamex 8,41 U/g). O grau de hidrolise (GH) foi monitorado ao longo do processo, e foi determinado de acordo com o item 4.13. Quando este se tornou constante, a reação foi interrompida pela inativação da enzima (90 °C/10 min) em banho termostatizado (QUIMIS, modelo 218.2 – Brasil). Após o resfriamento, à temperatura ambiente, as amostras

foram centrifugadas (3220 x g por 20 min)) (BIOSYSTEMS MPW-350/350-R – Brasil), o sobrenadante foi liofilizado (EDWARDS, Brasil), e depois armazenado em à -18 ± 2 °C para posteriores análises.

## 4.13 Grau de hidrólise

O grau de hidrólise foi medido pelo método do pH-stat, segundo Adler-Nissen (1986) apud Geirsdóttir (2009), podendo ser calculado segundo a equação 1.

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

Sendo: $h_{tot}$ é o número de ligações peptidicas (moles equiv/kg) para pescado este valor é 8,6 moles equiv/kg (ADLER-NISSEN, 1986 apud GEIRSDOTTIR, 2009); $B$ é o volume da base consumida durante a hidrólise para manter o pH constante (mL); $N_B$ é a normalidade da base; MP é a massa de proteína (g, determinado em N x fator de Kjeldahl); e α é o grau de dissociação. O grau de dissociação α é calculado segundo a equação 2.

$$\alpha = \frac{10^{pH-pK}}{1+10^{pH-pK}} \tag{2}$$

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

Os valores de p$K$ a diferentes temperaturas, pode ser calculado segundo a equação 3.

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

Sendo: $T$ a temperatura em Kelvin.

## 4.14 Fracionamento dos hidrolisados proteicos obtidos do IP e dos OD

Os hidrolisados foram fracionados utilizando a metodologia adaptada de Centenaro (2011) utilizando uma célula de ultrafiltração com agitação magnética e capacidade de 300 mL. As membranas de ultrafiltração (Millipore Corporation, Billerica, U.S.A., de celulose regenerada, 76 mm de diâmetro) usadas foram as de peso molecular de corte (cut-off)

de 1 e 3 kDa. Antes de cada filtração as membranas foram lavadas com $H_2O$ MILLI-Q, conforme determinação do fabricante das membranas. Durante cada processo de filtração aplicou-se pressão com gás nitrogênio de 60 psi. As amostras foram passadas através das membranas numa concentração de 0,0075 g/mL (CARREIRA et al., 2003), onde foram coletadas 3 frações: fração > 3 kDa, fração < 3 kDa e a fração < 1 kDa. Em seguida as amostras foram liofilizadas e analisadas.

### 4.15 Determinação de grupos sulfidrila (-SH)

O teor total dos grupos sulfidrila (T-SH) foi determinado utilizando o reagente de Ellman (5,5 ditiobis-ácido 2-nitrobenzóico, 10 mmol/L) de acordo com o procedimento descrito por Shimada e Cheftel (1988) com modificações. Amostras (10 mg) de proteína liofilizada foram homogeneizadas durante 3 min com 5 mL de tampão fosfato 0,1 M, pH 8,0, contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 1 mM, 6 M uréia e 0,5 % dodecil sulfato de sódio (SDS). Em seguida, a mistura foi centrifugada a 9000 x *g* (Biosystems, modelo MPW-350/350R) durante 20 min. No sobrenadante (3 mL) foram adicionados 30 μL do reagente de Ellman e a mistura foi incubada 15 min à temperatura ambiente. Após a reação, a absorbância da mistura foi medida a 412 nm em espectrofotômetro (Biospectro UV, modelo SP-22, Brasil). Os grupos R-SH foram determinados utilizando um coeficiente de extinção molar de 13600 $M^{-1}$ $cm^{-1}$ (ELLMAN, 1959).

### 4.16 Determinação da atividade antioxidante '*in vivo*'

#### 4.16.1 Cultura celular

As células de hepatócitos de zebrafish ($10^6$/mL) foram incubadas em placas de cultura celular de 24 poços e deixaram-se aderir durante 24 h, em seguida, as células foram expostas a concentrações do peptídeo (1,0, 0,1, 0,01 e 0,001 mg/mL) e ao controle (meio de cultura e água ultra pura);. Quatro replicados foram utilizados para cada tratamento. Depois da exposição no escuro, as células foram lavadas com tampão fosfato (PBS), novamente suspensas com suspensão de tripsina (0,25% v/v) e armazenadas para análise da viabilidade celular e concentração de espécies reativas de oxigênio (COSTA et al., 2012).

### 4.16.2 Viabilidade celular

As contagens celulares foram realizadas em 800 µL de suspensão de células de hepatócitos de zebrafish. O número de células de cada grupo foi contado com um microscópio óptico em 40 X. Quatro diluições em série foram feitas (100%, 75%, 50% e 25%) para cada conjunto de células, com o meio de cultura. A absorbância de cada suspensão de células foi determinada num leitor de placas de ELISA (Biotek Elx 800) a 630 nm (COSTA et al., 2012).

### 4.16.3 Determinação da funcionalidade da desidrogenase mitocondrial

A funcionalidade da desidrogenase mitocondrial foi determinada pelo ensaio de MTT (brometo de 2 - (4, 5-dimetil-2-tiazolil) -3, brometo de 5-difenil-2H-tetrazólio)), depois de 30 min a 28 °C no escuro, a placa foi centrifugada a 600 x g durante 7 min, o sobrenadante foi rejeitado e no precipitado foi adicionado o dimetil sulfóxido (DMSO), foram então realizadas as leituras em um leitor de placas de ELISA (Biotek Lx 800) a 490 nm (COSTA et al., 2012).

### 4.16.4 Determinação da concentração intracelular de espécies reativas ao oxigênio (ERO)

Imediatamente após a exposição das células as soluções peptidicas, estas foram centrifugadas a 600 x g durante 5 min a 10 °C. O sedimento celular foi novamente suspenso em tampão fosfato salino (PBS) contendo diacetato de 2,7 'diclorodihidrofluoresceina ($H_2$DCF-DA, 40 µM). A fluorescência foi lida a 28 °C durante 70 min, utilizando um fluorímetro de leitura de placas (Victor 2, Perkin Elmer), com excitação e comprimento de onda de emissão de 485 e 520 nm, respectivamente. Os níveis de ERO foram expressos em termos de área de fluorescência, após o ajuste de dados de fluorescência para uma equação polinominal de segunda ordem com integração entre zero e 70 min, a fim de se obter a área gráfica (COSTA et al., 2012).

## 4.17 Determinação da atividade antimicrobiana

Os testes da atividade antimicrobiana das frações peptídicas obtidas a partir da hidrólise do IP e dos OC foram realizados pelo teste de inibição de acordo com a CLSI

(2003). A zona de inibição em meio sólido foi usada para determinar o efeito antimicrobiano dos peptídeos contra *S.* Enteritidis e *S. aureus* Os micro-organismos foram incubados em meio Brain Heart Infusion (BHI) (Oxoid Ltd., Hampshire, Inglaterra) durante 24 h, para obter uma turbidez padrão correspondente ao número de 0,5 da escala de McFarland (1-2 x $10^8$ UFC/mL). Em seguida, foi inoculado 100 µL da suspensão com inóculo (1 a 2 x $10^8$ UFC/mL) e em toda a superfície da placa de Petri contendo Plate Count Agar (Oxoid Ltd., Hampshire, Inglaterra) e então foram colocados os discos de papel filtro de 0,6 mm de diâmetro contendo a solução de peptídeos nas concentrações de (0,1 e 0,2 g/mL), as placas foram incubadas invertidas a 37 ºC durante 24 h e os diâmetros das zonas de inibição em torno de cada disco foram medidos em quatro pontos diferentes, com auxilio de um paquimetro. (ROCHA et al., 2014; ROCHA, 2012; MENEZES, 2014).

## 4.18 Análise estatística

Para avaliação estatísticas dos resultados foi utilizada a análise de variância (ANOVA) e teste Tukey HSD para múltiplas comparações, utilizando como ferramenta o Software Statistica 7.0. Para os resultados da concentração de ERO intracelular em células de hepatócitos de Zebrafish, foi utilizada análise de variância (ANOVA), seguido de comparações post-hoc de Newmann Keuls.

# 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 5.1 Composição química da carne mecanicamente separada (CMS), do isolado proteico (IP), dos ossos (O) e dos ossos desmineralizados (OD) de corvina.

Inicialmente foi analisada a composição proximal da carne mecanicamente separada (CMS), do isolado proteico (IP) (Tabela 1), dos ossos (O) e dos ossos desmineralizados (OD) (Tabela 2) da corvina, sendo o conteúdo de umidade respectivamente de 78,5 % (± 0,1), 7,4 % (± 0,1), 9,2 % (± 0,8) e 6,4 % (± 0,4).

**Tabela 1:** Composição proximal da carne mecanicamente separada (CMS) e do isolado proteico (IP).

| Componentes | CMS (%) | IP (%) |
|---|---|---|
| **Proteína (bs)** | 81,2 ± 0,2[a] | 93,1 ± 1,8[b] |
| **Lipídeos (bs)** | 13,2 ± 0,1[a] | 0,2 ± 0,1[b] |
| **Cinzas (bs)** | 5,6 ± 0,1[a] | 1,3 ± 0,1[b] |

Todos os dados foram expressos como valores médios (média ± desvio padrão, n = 3). (bs) base seca. Letras iguais na mesma linha indicam que não há diferença significativa entre as amostras ($p > 0,05$).

**Tabela 2:** Composição proximal dos Ossos (O) e dos Ossos desmineralizados (OD).

| Componentes | O (%) | OD (%) |
|---|---|---|
| **Proteína (bs)** | 34,8 ± 2,2[a] | 44,5 ± 0,3[b] |
| **Lipídeos (bs)** | 25,5 ± 2,5[a] | 19,7 ± 0,4[b] |
| **Cinzas (bs)** | 41,1 ± 0,5[a] | 27,6 ± 0,7[b] |

Todos os dados foram expressos como valores médios (média ± desvio padrão, n = 3). (bs) base seca. Letras iguais na mesma linha indicam que não há diferença significativa entre as amostras ($p > 0,05$).

Analisando as Tabela 1, pode-se observar um aumento no teor de proteína da CMS para o IP, obtendo se valores de 81,2% para 93,1%, respectivamente, sendo possível com isso obter um isolado proteico a partir da carne mecanicamente separada da corvina, pois segundo Uzzan (1998) apud Frota (2007) para ser considerado isolado proteico o teor de proteína deve ser maior que 90%.

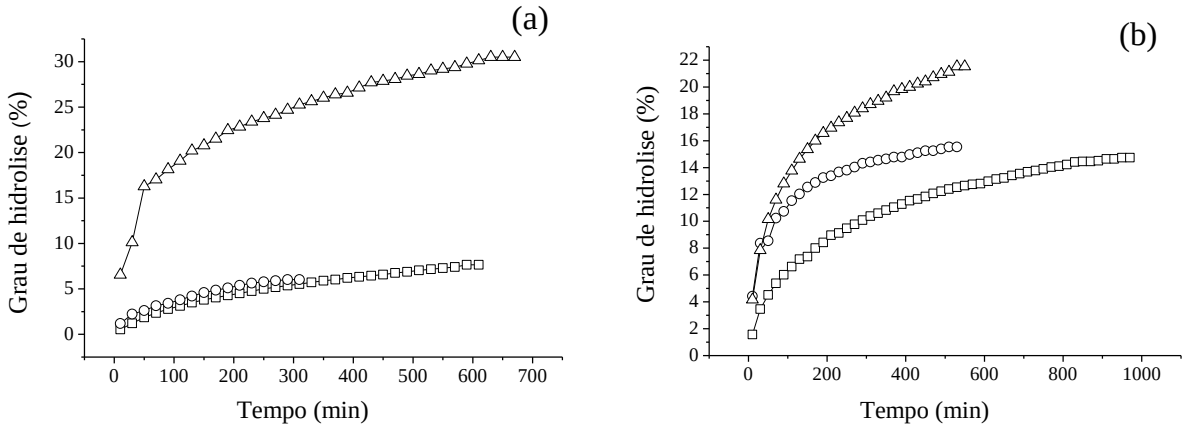
Na tabela 2 verificamos que o conteúdo de lipídeos e cinzas diminuíram 98,5% e 76,8%, respectivamente, essa diminuição no conteúdo de lipídeos é muito importante já que a oxidação lipídica leva ao desenvolvimento de odores e sabores indesejados e à produção de substâncias potencialmente tóxicas. (LIN et al., 2002). Fontana et al. (2009) encontraram valores semelhantes aos obtidos neste trabalho, alcançando valores de 97,7% de proteína, 1,5% de cinzas e 1,1% de lipídeos extraídos a partir do músculo de corvina. Freitas (2012) estudou o processamento de isolado proteico de resíduo de corvina e obteve valor menor de proteína 90% e cinzas 1,1% e valor de gordura superior 1,4%, quando comparados aos alcançados neste trabalho.

Com o processo de desmineralização dos ossos de corvina, o teor de cinzas foi reduzido em 32,8%, pode-se verificar também uma diminuição no conteúdo de lipídeos em 22,7% e aumento no teor de proteína em 27,8%, alcançando valor de 44,5%. Alfaro et al. (2010) utilizaram ossos de pescada-foguete (*Macrodon ancylodon*), para estudar o efeito de parâmetros de extração nas propriedades de gelatina e encontrou valores de proteína inferiores (28,08%) e cinzas superiores (63%), quando comparados com os obtidos neste trabalho. Jung et al. (2006) utilizando a polaca do Alasca (*Theragra chalcogramma*), encontraram valores semelhantes de proteína (43,5%), superiores de cinzas (42,2%) e inferiores de lipídios (13,3%), comparados ao valores obtidos neste trabalho.

## 5.2 Hidrolise enzimática do IP e dos OD de corvina.

A Figura 6 apresenta o comportamento da hidrólise enzimática e o grau de hidrólise das enzimas Alcalase, Flavourzyme e Protamex, utilizando como substrato o isolado proteico de corvina (Figura 6a) e os ossos desmineralizados de corvina (Figura 6b).

**Figura 6:** Gráfico do grau de hidrolise, para as enzimas: (□) Alcalase, (○) Flavourzyme e (Δ) Protamex (a), utilizando como substrado (a) IP e (b) OD.




Pode-se observar na Figura 6, que para as enzimas Alcalase e Flavourzyme o GH obtido foi de 6,0 e 5,9 % para o IP e de 14,7 e 15,5% para os OD, mostrando com isso que o substrato OD, apresentou valores maiores de GH, quando comparados com o substrato IP. Dong et al. (2008) quando hidrolisaram músculo de carpa prateada (*Hypophthalmichthys molitrix*) desengordurada, utilizando as enzimas Alcalase e Flavourzyme ($0{,}5{:}100_{p/p}$), chegaram a valores de GH de aproximadamente 25% e 10% respectivamente e pode se verificar que o período de rápida reação ocorreu até 60 min de hidrólise. Zavareze et al. (2009) utilizando polpa de cabrinha (*Prionotus punctatus*) obtiveram GH de 25,41% com a enzima Alcalase e 23,68% com a enzima Flavourzyme. Estes valores foram superiores aos encontrados neste trabalho, sendo o GH calculado por proteína solúvel e a concentração de enzima/substrato de 0,5% para Alcalase e 2% para a Flavourzyme, Alcalase e Flavourzyme com atividade específica de 36,0 e 22,2 U/mg de proteína, respectivamente (unidade de atividade (U) corresponde a 1 µmol de tirosina/h).

A enzima Protamex apresentou maior GH para os dois substratos testados, quando comparados com as enzimas Alcalase e Flavourzyme alcançando valores de 30,5% e 21,5% para o IP e OD respectivamente. Já Nguyen et al. (2011) hidrolisaram subprodutos de atum de nadadeira amarela (*Thunnus albacares*) usando a enzima Protamex ($0{,}1\%_{p/p}$), encontraram comportamento semelhante, onde o período de intensa reação de hidrólise foi em 120 min, depois o GH diminuiu até fase constante, alcançando valores de GH de 32,3, 22,2 e 16,8 % para a cabeça, cauda e vísceras, respectivamente.

Os melhores resultados do GH foram alcançados quando se utilizou os ossos desmineralizados como substrato, quando comparado com o isolado proteico, apesar dos OD

apresentarem um conteúdo maior de substâncias interferentes no meio de reação enzimática (como: lipídeos e cinzas). Segundo Marques; Yamanaka (2008) algumas substâncias são capazes de interferir, de maneira específica, na taxa de uma reação de catálise enzimática, retardando ou reduzindo o processo ou a especificidade biológica da reação. Alguma inibição enzimática pode ocorrer devido à oxidação lipídica (MATSUSHITA et al., 1970).

Assim, a variação do pH durante o processo de isolamento de proteínas pode ter influenciado para um menor valor de GH do IP, pois se trabalha com mudanças de pH que pode modificar a estrutura da proteína e dificultar a ação da enzima. O pH, assim como a força iônica, pode alterar a distribuição das cargas nas cadeias laterais das proteínas, causando aumento ou diminuição das interações proteína-proteína (GOSSET; RIZVI; BAKER, 1984).

As curvas do grau de hidrólise apresentaram alta taxa de reação até um período de 100 min pra todas as enzimas quando utilizado como substrato os OD (Figura 6b), depois pode se verificar uma diminuição na taxa de reação da hidrólise ao longo do tempo. Já para o substrato IP a Protamex foi a única enzima a apresentar este mesmo comportamento (Figura 6a). Segundo Guérard, Guimas e Binet (2002) a cinética da reação pode ser dividida em duas diferentes fases: a primeira fase em que a velocidade da reação é rápida, que corresponde uma clivagem fácil de peptídeo, e a segunda etapa, onde a velocidade da reação diminuiu devido a hidrólise de proteínas mais compactas, ou também devido ao aumento de peptídeos.

A menor taxa de reação apresentada pelas enzimas Alcalase e Flavourzyme, para os dois substratos pode ter ocorrido devido à afinidade da enzima pelo substrato, assim como o diferente comportamento apresentado pela hidrólise das proteínas da mesma matéria prima pelas diferentes enzimas. Enzimas são catalisadores muito eficientes porque se ligam ao substrato (e cofactores) no sitio ativo da ligação peptidica estereoespecificamente orientada na proximidade dos grupos catalíticos que realizam as reações, formando o complexo enzima substrato (WHITAKER; VORAGEN; WONG, 2003).

Mohr, apud Martins; Costa; Prentice-Hernández (2009) observou que, durante o aquecimento à temperatura da hidrólise, as proteínas da fração sarcoplasmática podem desnaturar e precipitar. Isto é mais evidente quando o material "*in natura*" é aquecido antes para inativar as enzimas endógenas do pescado. Estas proteínas desnaturadas são, aparentemente, altamente resistentes à quebra enzimática, consequentemente, só uma parte minoritária das proteínas desnaturadas será solubilizada durante a subsequente hidrólise enzimática. Devido ao exposto o aquecimento inicial da CMS e dos OD para inativação das enzimas endógenas também pode ter afetado a atividade das enzimas, quando utilizado o IP, por isso apresentou menores valores de GH, ao contrário o aquecimento parece ter

influenciado positivamente para os OD, uma vez que este é composto basicamente de proteínas do colágeno. Segundo Powell; Hunt; Dikeman (2000), durante o aquecimento, a molécula de colágeno, quando em solução, se desnatura a uma temperatura de 36ºC, mantendo ainda sua estrutura e estabilidade devido à energia de cristalização da tríplice-hélice até a temperatura alcançar valores próximos de 64ºC, á medida que a desnaturação continua, a tríplice-hélice começa a se quebrar nos terminais da molécula fazendo com que esta proteína encolha aproximadamente um quarto do seu comprimento original, entretanto, quando na presença de água e em aquecimentos superiores a 70 a 80ºC, o colágeno se solubiliza parcialmente devido à hidrólise de algumas ligações peptídicas nas regiões polares da molécula.

O percentual de tirosina livre dos hidrolisados proteicos obtidos pelo processo de hidrólise do isolado proteico de corvina e dos ossos desmineralizados de corvina, utilizando as enzimas Alcalase, Flavourzyme e Protamex está apresentado na Tabela 3.

**Tabela 3:** Porcentual de tirosina livre dos hidrolisados obtidos pela hidrolise do isolado proteico (IP) e dos ossos desmineralizados (OD).

| | **IP** | **OD** |
|---|---|---|
| **Enzimas** | **Tirosina (%)** | |
| **Alcalase** | $2,8 \pm 0,2^{bB}$ | $9,0 \pm 0,3^{bA}$ |
| **Flavourzyme** | $3,0 \pm 0,1^{bB}$ | $11,5 \pm 0,2^{aA}$ |
| **Protamex** | $6,7 \pm 0,3^{aA}$ | $5,7 \pm 0,2^{cB}$ |

Letras minúsculas iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa entre as diferentes enzimas ($p > 0,05$) e letras maiúsculas iguais na mesma linha, indicam que não há diferença significativa entre as amostras IP e OD para as diferentes enzimas ($p > 0,05$).

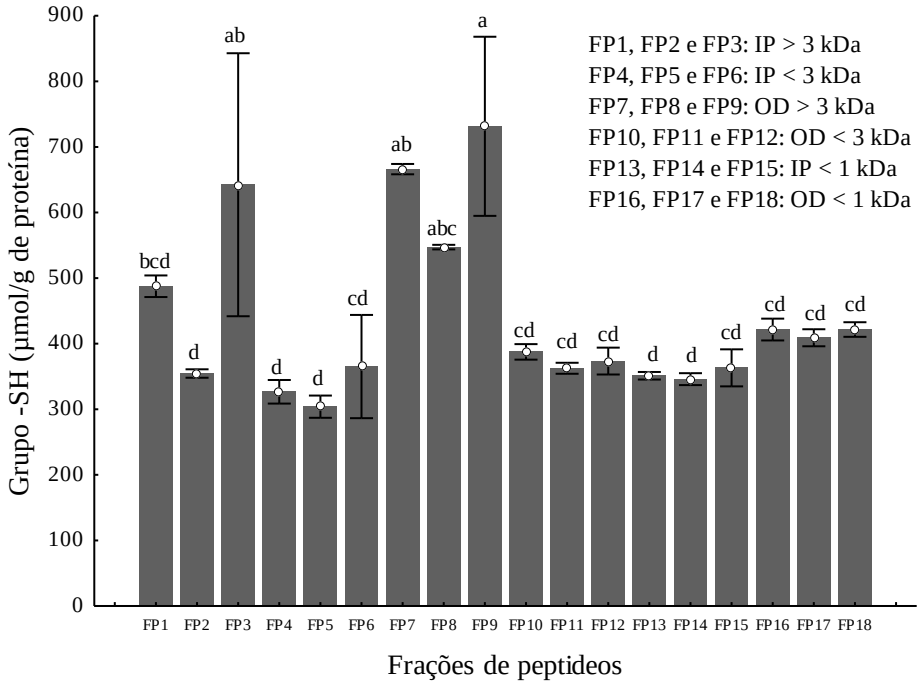
O percentual de tirosina livre foi maior quando utilizado o substrato OD, para todas as enzimas Alcalase e Flavourzyme, apresentando diferença estatística ($p < 0,05$). já para a enzima Protamex o percentual de tirosina livre foi maior significativamente ($p < 0,05$) quando utilizado como substrato o IP. Analisando a Figura 6 e Tabela 3, pode-se notar que o GH e o percentual de tirosina livre não são proporcionais. Com isso se observa a diferença de clivagem das proteínas para cada enzima, sendo Alcalase uma endopeptidase e a Flavourzyme e Protamex uma mistura de endo e exopeptidase. As endopeptidases hidrolisam as ligações peptidicas nas moléculas de proteína de forma aleatória para produzir peptídeos relativamente grandes. As exoproteases sistematicamente removem os aminoácidos do N-terminal ou no C-

terminal ou por hidrólise de peptídeos nas ligações terminais (CLEMENTE, 2000). Segundo Guérard; Guimas; Binet (2002) os peptídeos solúveis podem atuar como substrato, concorrendo com as proteínas para ser hidrolisados ou parcialmente hidrolisados pela enzima; isso pode ter ocorrido quando hidrolisados os OD, devido a isso ocorreu maior conteúdo de tirosina livre quando utilizado as enzimas Alcalase e Flavourzyme e menor GH, quando comparado com a Protamex que obteve o maior GH e menor conteúdo de tirosina livre, uma vez que o GH foi determinado por queda do pH e não por conteúdo de tirosina livre.

### 5.3 Concentração de grupos sulfidrilas

Na Figura 7 é mostrada a concentracão de grupos sulfidrílas das diferentes amostras de frações peptidicas, obtidas pelo processo de hidrolise enzimática.

**Figura 7**: Concentração de grupos sulfidrílas das diferentes amostras de peptídeos, sendo: FP1, FP4, FP7, FP10, FP13 e FP16 = Fração obtida utilizando a enzima Flavourzyme; FP2, FP5, FP8, FP11, FP14, FP17 = Fração obtido utilizando a enzima Alcalase; FP3, FP6, FP9, FP12, FP15 e FP18 = Fração obtido utilizando a enzima Protamex, onde letras iguais indicam que não há diferença estatística significativa entre as amostras (p > 0,05).




Analisando a Figura 7 podemos notar que os valores das concentrações de grupos sulfidrilas (–SH) variaram de 304 a 731,4 µmol/g de proteína, as frações de peptídeos FP9,

FP7 e FP3 apresentaram maiores valores de grupamentos –SH, sendo os valores de 731,4, 666,2 e 642,3 µmol/g de proteína, respectivamente, seguido das amostras FP8 valor de 547,2 e FP1 valor de 487,6 µmol/g de proteína, sendo que apenas a amostra FP9 e FP1 apresentaram diferença estatística significativa ($p < 0,05$), valores estes maiores que os encontrados por Centenaro (2011) que encontrou maior conteúdo de grupos sulfidrila totais de 4,7±2,6 µmol/g de proteína, em amostras de hidrolisadas de músculo de pescado com a enzima Flavourzyme.

Entre as frações maiores que 3 kDa (FP9, FP8 e FP7), provenientes dos ossos de corvina e as frações (FP3, FP2 e FP1) também maiores que 3 kDa, estas provenientes do isolado proteico, que apresentaram maior conteúdo de Grupos –SH, destacam-se FP9 e FP3, que foram hidrolisadas utilizando a enzima Protamex, que entre as três enzimas utilizadas foram as amostras que apresetaram maior grau de hidrólise, e elevado conteúdo de grupos sulfidrilas, isso pode ter ocorrido, devido a esta enzima conter uma mistura de endo e exopeptidase, que são responsáveis pela maior liberação de aminoácido livres, podendo desta forma obter como produto maior conteúdo de cisteína, segundo Pacheco et al. (2005) o maior conteúdo de grupos sulfidrilas livres, ocorreu provavelmente devido à maior liberação de cisteína e peptídeos de baixa massa molar contendo cisteína.

Dessa forma, para realizar a análise da possível atividade antioxidante em culturas de hepatócitos de zebrafish a amostra FP9 foi a escolhida, pois esta foi uma das quatro amostras que obtiveram o maior valor de grupamento –SH, e devido a esta ser obtida dos OD necessitando desta maneira menor processo quando comparada ao IP e também porque esta apresentou maior grau de hidrolise (utilizando a enzima Protamex) em menor tempo e com isso se diminui os custos para sua obtenção. Segundo Höehr; Júnior; Kubota (2001) a síntese de glutationa irá variar de acordo com a biodisponibilidade dos aminoácidos, mais concretamente da cisteína, este aminoácido apresenta na sua estutura um componente que o caracteriza bioquimicamente, o enxofre, designado de grupo tiol. Este grupo vai conferir à glutationa a capacidade de desempenhar as funções que lhe são características e de importância vital no organismo. A glutationa é o principal antioxidante poduzindo pela célula e sua função principal é a proteção contra radicais livres (LOMAESTRO; MALONE, 1995).

E as amostras escolhidas para realizar a analise da possível atividade antimicrobiana foram as provenientes do IP e dos OD na fração maior que 3 kDa, pois segundo Whitmore; Wallace (2004) indicaram que a cadeia longa é também uma exigência dos peptaibols para ser capaz de penetrar as camadas duplas de lípidos e formar canais. O analisado também por Su et al. (2012), que examinaram a interação entre trichokonin VI, um peptaibol isolado a partir de *Trichoderma pseudokoningii* contra *Bacillus subtilis* uma

bactéria Gram-positiva. Trichokonin VI foi eficaz contra *B. subtilis* com uma concentração inibitória mínima de 25 µM. A parede celular de *B. subtilis* foi danificada e a rugosidade aumentada após o tratamento com trichokonin VI.

E corroborando com este fato devido ao alto conteúdo de grupos sulfiidrilas. Compostos fenólicos hidroxilados atuam possivelmente na atividade antimicrobiana, por inibição de enzimas através de reações com grupos sulfidrilas e por interações inespecíficas com proteínas, embora não tenha sido comprovada uma relação entre o grau de hidroxilação e a atividade tóxica. (ZACCHINO et al., 1998).

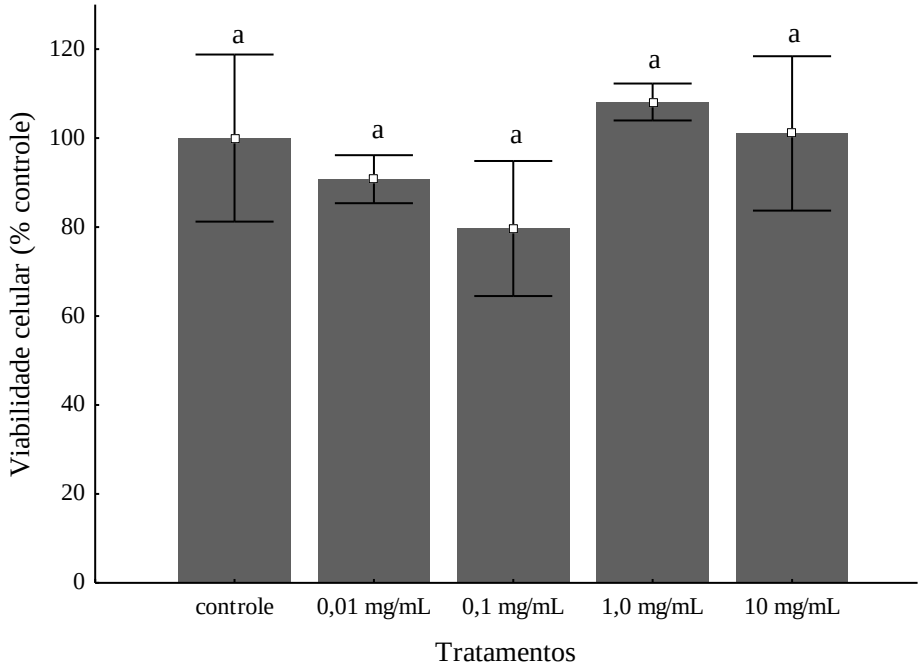
## 5.4 Atividade Antioxidante

Foi analisada a possível atividade antioxidante dos peptídeos em culturas de hepatócitos de zebrafish (estirpe ZFL) foi analisada a partir da amostra FP9, que apresentou a maior concentração de grupos sulfidrila (Figura 7). A escolha desta fração > 3 kDa foi também, devido a outros autores verificaram a atividade antioxidante em peptídeos nesta faixa de masssa molecular. Segundo Puchalska; Marina; García (2014), a maior capacidade antioxidante "*in vitro*" foi encontrada na fração de peptídeo de 5 a 10 kDa obtida a partir de fórmulas comerciais infantis à base de soja. Wang et al. (2012), analisaram peptídeos de 1 a 10 kDa obtidos de hidrolizados de proteínas da clara do ovo em pó, e os resultados do planejamento Box-Behnken (BBD), indicaram que as condições ótimas para a atividade antioxidante foram: concentração de peptídeos 8 mg/mL, a intensidade do campo elétrico de 10 kV/cm e pulso de frequências 2400 Hz. Sob estas condições, a atividade antioxidante da fração de peptídeos foi de 62,64 %, a atividade antioxidante foi avaliada utilizando ensaio de inibição do radical 2,2-difenil-1picrilhidrazil (DPPH).

A atividade antioxidante foi determinada a partir da concentração de espécies reativas ao oxigênio intracelular (ERO), em células de hepatócitos de Zebrafish. Os resultados da analise da concentração de ERO da fração de peptídeo FP9, assim como a viabilidade celular são mostrados nas Figuras 10, 11, respectivamente.

A Figura 8 apresenta o gráfico da viabilidade celular, analisadas a partir de células de hepatócitos de Zebrafish, frente à fração peptídica maior 3 kDa, obtida dos ossos desmineralizados, utilizando a enzima Protamex (FP9).

**Figura 8**: Viabilidade das células de hepatócitos de Zebrafish, frente à fração peptídica do hidrolisado do OD, obtido utilizando a enzima Protamex (>3 kDa). Todos os dados foram expressos como valores médios (média ± desvio padrão, n = 4), letras iguais indicam que não há diferença estatística significativa entre as amostras (p > 0,05).




A Figura 8 mostra os resultados de viabilidade celular frente a FP9, podemos observar que não houve diferença estatisticamente significativa (p < 0,05) das concentrações em relação ao controle, mostrando desta forma que o FP9 não foi tóxico para a célula, uma vez que não provocou um aumento da lise celular comparado com o controle.

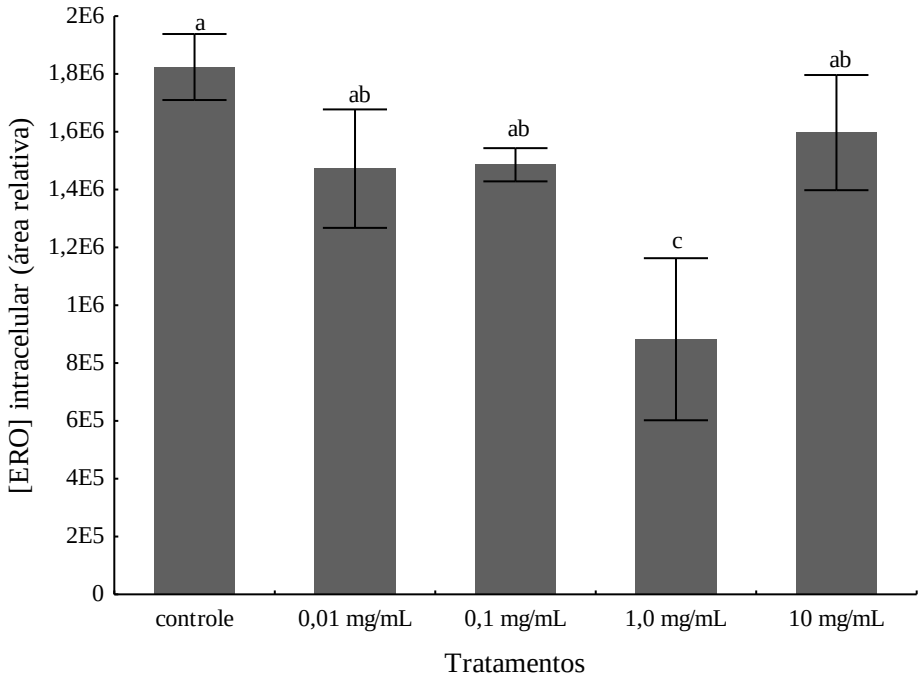
As células expostas a substâncias biologicamente prejudiciais podem sofrer alterações na morfologia, na taxa de crescimento celular, morte celular e desintegração celular. Portanto, o monitoramento da viabilidade celular deve ser obrigatoriamente realizado para cada composto (MIRET; GROENE; KLAFFKE, 2006). O MTT pode detectar alterações na atividade mitocondrial. Mosmann (1983) mostra que apenas células vivas reagem ativamente ao MTT, enquanto que em células mortas reação é praticamente nula, mesmo imediatamente após a lise celular. Estes resultados sugerem que a vida celular com mitocôndrias ativas é necessária e levantou a possibilidade de que a quantidade de formazano gerado pelas células depende do nível de energia do metabolismo da célula.

Rajapakse et al. (2005), verificaram alteração na sobrevivencia das células de fibroblastos pulmonares humanos (ATCC CCL-75), onde concentrações acima de 75 µg/mL, de um hepta-peptideo de sequência, His-Phe-Gly-Asp-Pro-Phe-His, não foram eficazes contra

lesões causadas pelo estresse oxidativo e afetaram a sobrevivência das células, mas observaram também que a sobrevivência da células de fibroblastos foi de 76% em comparação com o controle, com peptídeo na concentração 75 µg/mL, sendo este quase semelhante à atividade observada ao α-tocoferol, que foi de 72%.

Com os resultados obtidos na viabilidade celular, que mostram que a fração de peptídeo FP9 não foi tóxica pra as células de hepatócitos de Zebrafish foi possível determinar a atividade antioxidante desta fração de peptídeos pela analise da concentração de espécies reativas ao oxigênio intracelular, como se pode observar na Figura 9.

**Figura 9**: Especies reativas ao oxigênio intracelular em células de hepatócitos de Zebrafish, frente à fração peptídica do hidrolisado do OD, obtido utilizando a enzima Protamex (>3 kDa). Todos os dados foram expressos como valores médios (média ± desvio padrão, n = 4 para o controle e n = 5 para os tratamentos), letras iguais indicam que não há diferença estatística significativa entre as amostras (p > 0,05).




Verificamos na Figura 9, que a concentração de 1,0 mg/mL da FP9, apresentou valor de ERO de 8,83 x $10^5$ diferindo do controle ($p < 0,05$) onde o valor foi de 1,82 x $10^6$, constatando a sua eficiencia na diminuição de ERO intracelular, e consequentemente na atividade antioxidante em cultura celular de hepatócitos de zebrafish, sendo que o aumento da concentração do peptídeo pode ter dificultado sua permeação pela membrana celular, e por consequencia o peptídeo não conseguiu agir, segundo Zasloff (2002) a via de permeação da

membrana pode variar para diferentes peptídeos de acordo com a sequência de aminoácidos, a composição da membrana lipídica, e a concentração de peptídeo. E ainda segundo Marcuse (1960) varios aminoácidos como: tirosina, metionina, histidina, triptofano e prolina, tem mostrado que atua como antioxidantes, embora em casos específicos (por exemplo, elevada concentração) eles também podem agir como pró-oxidantes. Segundo Schafer; Buettner (2001), as mudanças no balanço redox de sistemas biológicos podem causar o estresse oxidativo. A intensidade e gravidade destes desequilíbrios vão depender, naturalmente, das concentrações locais de espécies pró e antioxidantes e das constantes de velocidade de reação com a molécula-alvo (GOW; ISCHIROPOULOS, 2001).

Há fortes evidências de que o estresse oxidativo tem importância capital nos processos de envelhecimento, transformação e morte celular, com consequências diretas em muitos processos patológicos, como a indução do câncer, bem como na fisiopatologia de muitas doenças crônicas, entre elas, doenças auto-imunes, cardiopatias, câncer, doenças pulmonares, intoxicação por xenobióticos e muitas outras (PAGANO et al., 1998). Wu et al. (2013), mostraram com seus resultados que os peptídeos antioxidantes diminuiram o progresso de formação de rugas e a elasticidade da pele, desencadeados pela indução de irradiação UVB em camundongo fêmea de (18 a 20 g), é também controlada de forma significativa a velocidade de peroxidação lipídica e da redução da atividade de dismutase (SOD), glutationa peroxidase (GPH–Px), hidroxiprodrolina e catalase (CAT). Análises histopatológicas mostraram que os peptídeos derivados de antioxidantes podem reduzir a proporção da espessura da derme e epiderme e aumentar o índice mitótico de células basais, a contagem de fibroblastos, a densidade das fibras do colágeno e a densidade micro vascular dérmica.

Rajapakse et al. (2005) verificaram atividade antioxidante "*in vitro*" de um peptídeo purificado de sequência His-Phe-Gly-Asp-Pro-Phe-His de massa molecular 962 kDa, utilizando concentrações mais baixas (200 µg/mL) do que as deste trabalho. Encontrando poder sequestrante superóxido (8%), hidroxilo (96%), carbono centralizado (91%) e os radicais DPPH (72%) e os respectivos valores de $IC_{50}$ foram 21, 34, 52 e 96 µM. Este peptídeo foi purificado a partir de fermentados derivados de mexilhão azul marinho (*Mytilus edulis*).

Através do processo de hidrólise enzimática, Lee et al. (2013) verificaram atividade antioxidante '*in vitro*'de um hexa-peptídeo sintético derivado da hidrolisado enzimático do subproduto pele de pato, mostrando que o peptideo sintetizado de massa molecular de 693,90 Da e sequências de aminoácidos Trp-Tyr-Pro-Ala-Ala-Pro, apresentou

atividade antioxidante, sendo que os valores da metade da concentração máxima inibitória ($IC_{50}$), para os ensaios de hidroxilo, DPPH, alquilo, e eliminação de radicais superóxido foram de 45,2, 18,5, 31,5, e 33,4 µM, respectivamente. E a partir de hidrolisados de ossos Centenaro (2011) também encontrou atividade antioxidante "*in vitro*" de frações peptídicas obtidas de hidrolisados de ossos de castanha (*Umbrina canosai*) e de frango (*Gallus domesticus*) com diferentes proteases (Flavourzyme, α-Quimotripsina e Tripsina), sendo que os hidrolisados de ossos de pescado (PF) e ossos de frango (FF) produzidos com a enzima Flavourzyme foram os que melhores resultados de atividade antioxidante, apresentando elevada atividade de inibição da peroxidação lipídica (77,3 e 61,6% respectivamente) e moderada atividade de sequestro do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril hidrazil), radical ABTS (2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)) e radical hidroxila.

A amostra FP9 apresentou elevado conteúdo de grupamentos SH, e provavelmente uma maior quantidade do aminoácido cisteína, o que pode ter conferido a esta fração a atividade sequestrante de ERO, já que o conteúdo de SH porece estar associado ao maior conteúdo de cisteína. Segundo HÖEHR; JÚNIOR; KUBOTA (2001) a síntese de glutationa irá variar de acordo com a biodisponibilidade dos aminoácidos, mais concretamente da cisteína, uma vez que este aminoácido é dos três o mais escasso nos alimentos, sendo que a glutationa é o principal antioxidante produzindo pela célula, sendo sua função principal, proteger a célula da influência de radicais livres (Lomaestro; Malone, 1995). Para que possa proteger melhor a própria célula tem estratégias de combate à agressão por parte dos ERO, como mitocôndria e núcleo, que tem a sua própria reserva de glutationa reduzida (GSH), protegendo individualmente estas estruturas contra a ação destas espécies. Esta proteção é crucial, pois a alteração do estado redox intracelular pode implicar processos pré-mutagenicos no DNA (LU, 2009).

He et al. (2012) verificaram a capacidade antioxidante '*in vitro*' de frações de peptídeos contendo cisteína. Neste estudo, os peptídeos foram preparados por fermentação em estado sólido de proteínas de colza com *Bacillus subtilis*. Os peptídeos de colza eram compostos principalmente de cinco frações de tamanho de 180 a 5500 Da, no entanto, o ácido glutâmico (19,5%), lisina (7,6%) e prolina (7,3%) foram os aminoácidos mais dominantes presentes, mas em menor quantidade estavam presentes a serina (1,5%), triptofano (1,3%) e cisteína (0,5%). Os resultados motraram alta atividade de eliminação de radicais livres, poder redutor e inibição da peroxidação lipídica e mais baixa atividade quelante de íons ferroso.

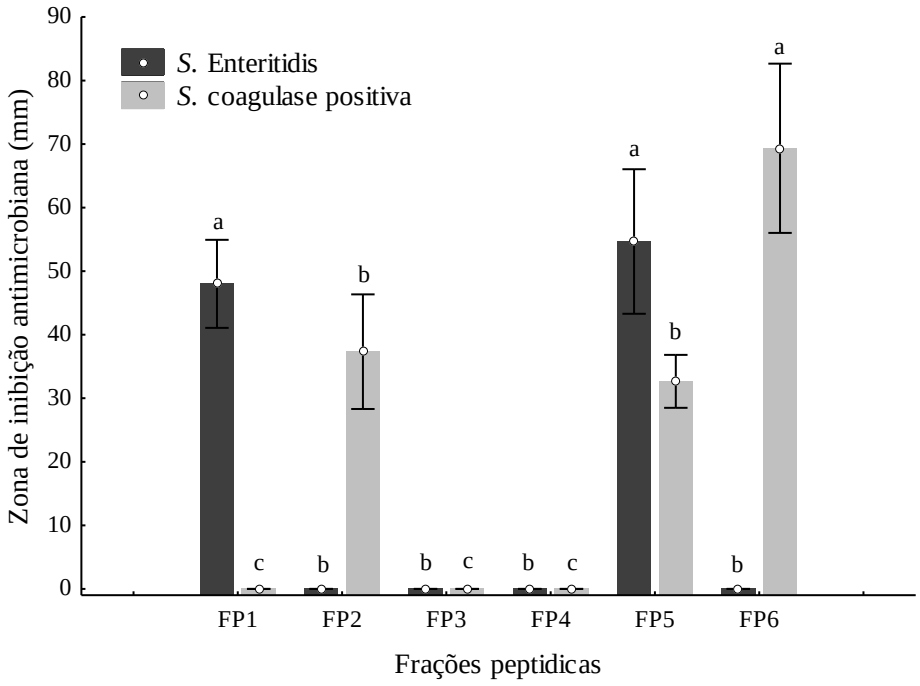
A fração com maior atividade antioxidante e maior conteúdo de aminoácidos contendo resíduos sulfúdricos foi também foi verificada por Centenaro (2011), sendo que a

atividade antioxidante foi testada sobre peptídeos obtidos de músculo de pescado e frango, usando as enzimas proteolíticas Flavourzyme e α-Quimotripsina. A fração que apresentou, em geral, maior potencial antioxidante foi maior que 1 kDa do hidrolisado de pescado obtido com a enzima Flavourzyme. E quando se adicionaram 40 mg/mL de hidrolisado de pescado utilizando a enzima Flavourzyme (HPF) e hidrolisado de frango, utilizando a enzima α-Quimotripsina (HFQ), 93 e 80% da oxidação lipídica foi obtida, respectivamente, sobre homogeneizados de carne moída bovina. Duan et al. (2014), também encontraram atividade antioxidante em um peptídeo isolado de massa molecular de 1291,51 Da, correspondente ao fragmento 302-313 da transferrina do ovo. A previsão conformacional e espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier sugeriu que o peptideo possuia conformação em β-folhas. Esse peptídeo mostrou uma proporção de inibição de 60,20 % em autoxidação de ácido linoleico e um efeito inibitório ($IC_{50}$ de 312 µM) sobre os radicais ABTS (2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)).

## 5.5 Atividade Antimicrobiana

A partir de testes preliminares as concentrações de peptídeos utilizadas para analisar a atividade antimicrobiana foram 100 e 200 mg/mL, sendo que a bactéria *Salmonella* Enteritidis não apresentou zona de inibição para a concentração de 200 mg/mL, e *Staphylococcus* coagulase positiva não apresentou zona de inibição para a concentração de 100 mg/mL. Como já mencionado no item 5.3, as frações de peptídeos utilizadas para essa análise foram as FP1, FP2, FP3, FP7, FP8 e FP9. São frações estas maiores 3 kDa, sendo que as três primeiras foram obtidas através do processo de hidrólise, utilizando como substrato o IP e as três últimas através do processo de hidrolise, utilizando como substrado os OD (Figura 10).

**Figura 10:** Zona de inibição para os testes de atividade antimicrobiana de 6 frações de peptídeos (> 3kDa), contra *S.* Enterididis e *S.* coagulase positiva, onde: FP1: Hidrolisado do IP, obtido utilizando a enzima Flavourzyme, FP2: Hidrolisado do IP, obtido utilizando a enzima Alcalase, FP3: Hidrolisado do IP, obtido utilizando a enzima Protamex, FP7: Hidrolisado do OD, obtido utilizando a enzima Flavourzyme, FP8: Hidrolisado do OD, obtido utilizando a enzima Alcalase, FP9: Hidrolisado do OD, obtido utilizando a enzima Protamex. Todos os experimentos estão expressos como valores médios (média ± desvio padrão, n = 3). Letras iguais para o mesmo micro-organismo indicam que não houve diferença significativa entre as amostras (p > 0,05).




A Figura 10, apresenta os resultados dos testes da atividade antimicrobiana das 6 frações de peptídeos, frente as bactérias *S.* Enterididis e *S.* coagulase positiva. Pode-se notar que para a *S.* Enteritidis apenas duas frações peptidicas apresentaram zona de inibição: FP1 com valor de 48,0 mm e FP8 54,7 mm, sendo que não houve diferença estatística (p > 0,05) entre elas, Já para o *S.* coagulase positiva três frações exibiram zona de inibição FP2, FP8 e FP9, onde a FP9 apresentou diferença estatística em relação a FP2 e FP8 (p < 0,05), com maior zona de inibição, chegando a 69,3 mm. FP2 e FP8 apresentaram zona de inibição de 37,3 e 32,7 mm, respectivamente.

Esses resultados apresentaram maior atividade antimicrobiana do que os encontrados por Rocha et al. (2014) e Rocha (2012) que não obtiveram zona de inibição contra as bactérias *Salmonella* Enteritidis e *Staphylococcus aureus*, quando testaram filmes a base de proteínas de anchoita (*Engraulis anchoita*) incorporados com ácidos orgânicos. Manab et al. (2011) encontraram menor atividade antimicrobiana comparadas a este trabalho quando avaliaram a inibição de filmes à base de proteínas do soro de leite incorporados com ácidos orgânicos, encontrando zona de inibição mais elevada para *Escherichia coli* (11,6 mm) e mais baixa para *Salmonella sp.* (9,77 mm). Hayes et al. (2006) não detectaram zona de inibição contra a bactéria *Staphylococcus aureus* pelos peptídeos: IKHQGLPQE $\alpha_{s1}$- CN f(21-29), VLNENLLR $\alpha_{s1}$-CN f(30-38), SDIPNPI G SENSEK $\alpha_{s1}$-CN f(195-208), sintetizados a partir da fermentação de *L. Acidophilus* DPC6026 em caseinato de sódio. Menezes (2014) verificou que filmes a base de isolado protéico de carne mecanicamente separada de isolado proteico de frango, incorporados com 1,2% de óleo essencial de óregano obteve atividade antimicrobiana frente a *L. monocytogenes* e *S.* Enteritidis, quando aplicado como embalagem para fígado de frango com uma redução de 1,5 Log. UFC/g em relação ao filme controle, já em filmes à base de isolado protéico de carne mecanicamente separada de isolado proteico de frango, incorporados com montmorilonita (MMT), não apresentaram atividade antimicrobiana.

Lequeux et al. (2014) estudaram a ligação da nisina (um péptido antimicrobiano) ao ácido hialurónico (AH) para obter um biopolímero antimicrobiano sob forma de solução ou de gel e verificaram uma inibição microbiana de quase 100% em concentrações de peptídeos menores que as expostas neste trabalho, sendo que para *S. epidermidis*, 99,99% da população foi morta em 2 mg/mL e mais de 99,99% a 5 mg/mL. No caso de *S. aureus*, a atividade antibacteriana foi mais baixa (cerca de 99,70% de mortalidade) sendo observada a 5 mg/mL, confirmando a diferença de sensibilidade entre as duas espécies de *Staphylococcus*. No entanto, a 10 mg/mL foi observada uma eliminação total da população, mas deve-se levar em conta que esses peptídeos eram purificados e o obtidos neste trabalho não, devido a isso foi preciso uma maior concentração da fração de peptídeo para obter a inibição.

A Figura 11 mostra as imagens da zona de inibição formada pela atividade antimicrobiana das frações peptidicas testados, onde nas Figuras 11a e 11b, estão representadas a inibição contra a bactéria *S.* Enteritidis e a Figura 11c, 11d e e, representa a inibição contra a bactéria *S.* coagulase positiva.

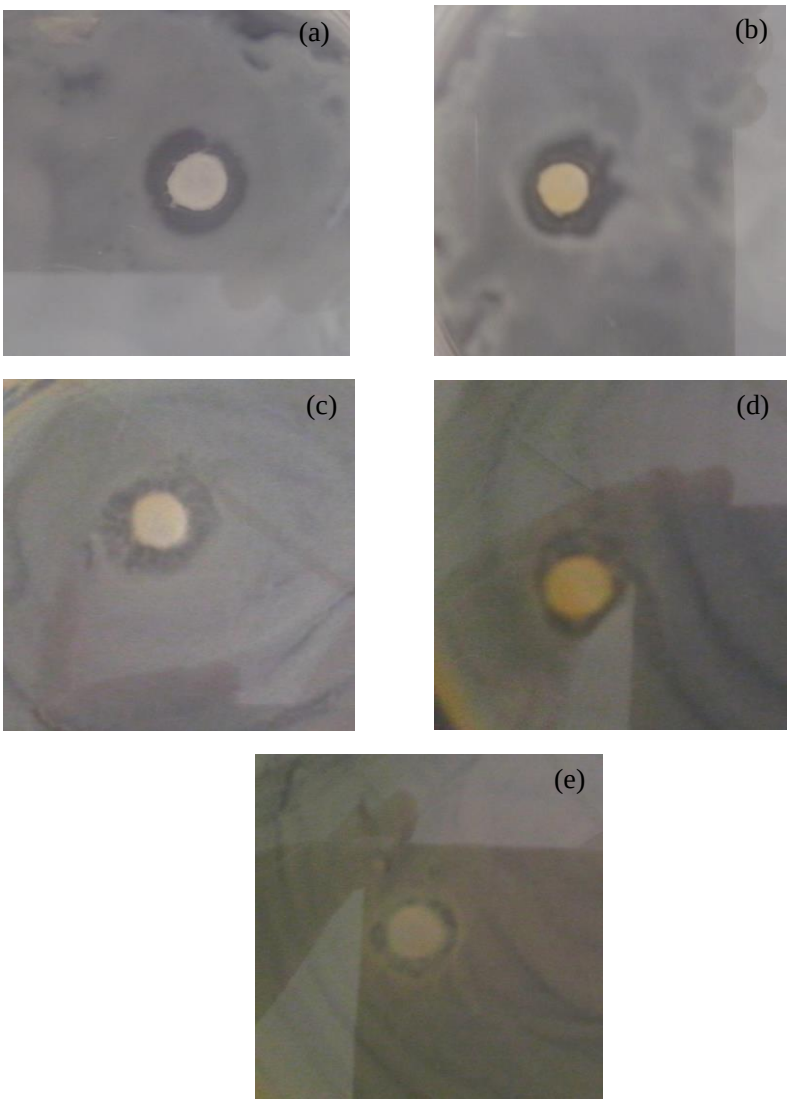
A bactéria *S.* coagulase positiva, apresentou zona de inibição, mas está inibição não foi total, pois apresentou um pequeno conteúdo de colônias no halo, como se pode

verificar na Figura 11. Isso pode ter ocorrido devido ao plaqueamento de uma concentração maior de células bacterianas, uma vez que a concentração final do inóculo foi verificada apenas por comparação da turbidez com a solução padrão de McFarland.

A inibição maior no número de colonias em *S.* Enteritidis também pode ter ocorrido devido às frações de peptídeos inibirem a síntese enzimatica de peptídeos para formar a camada de peptidoglicanos, pois segundo Murray; Rosenthal; Pfaller (2009) o peptidoglicano é contituido de um polissacarídeo contruído de unidades repetidas de N-acetilglicosamina e o ácido N-acetilmurâmico (MurNAc), e um tetrapeptídeo é ligado ao MurNAc, esse peptídeo é incomum porque contém aminoácidos, tanto D quanto L, e o peptídeo é produzido enzimaticamente ao invés de ser por um ribossomo.

O que pode ocorrer também é a bactéria utilizar esses peptídeos como fonte de nutriente para o seu crescimento, uma vez que estes peptídeos não foram purificados e no fracionamento apenas moléculas menores que 3 KDa foram separadas, na fração de peptídeos ainda pode conter algumas moléculas de proteína. Segundo Franco; Landgraf (2008) os micro-organismos podem utilizar como fonte de nitrogênio os aminoácidos, mas alguns outros micro-organismos são capazes de metabolizar nucleotídeos, enquanto outros metabolizam peptídeos e proteínas complexas. Algumas bactérias secretam enzimas que hidrolisam uma grande variedade de substrato proteico. Os peptídeos são parcialmente purificados, com isso podem possuir tanto compostos inibidores quanto compostos ativadores do crescimento bacteriano que podem fornecer, por exemplo, carbono favorecendo o crescimento das bactérias. (ALMEIDA, 2007).

**Figura 11**: Zona de inibição das frações de peptídeos contra as bactérias testadas, sendo: (a) FP1, (b) FP8 contra *S.* Enteritidis e (c) FP2, (d) FP8, (e) FP9 contra *S.* coagulase positiva.




As frações de peptídeos FP1, FP2 e FP9, tiveram inibição apenas para uma das bactérias testadas, onde FP1 não apresentou inibição para *S.* coagulase positiva e FP2 e FP9 não apresentou inibição para *S.* Enteritidis. Isso pode ter ocorrido pela diferença da composição da parede celular, uma vez que a *S.* Enteritidis é uma bactéria Gram-negativa e o *S.* coagulase positiva Gram-positiva, dificultando assim a ação dos peptídeos. Segundo Murray; Rosenthal; Pfaller (2009) as bactérias Gram-negativas contém uma membrana exterior que rodeia a camada de peptideoglicano, e nas Gram-positivas a membrana celular é rodeada por uma camada espessa de peptideoglicano, devido a isso a interação do peptídeo com a parede celular pode ter dificultado sua ação inibitória, sendo que é largamente aceito que os PAM interagem com as membranas das bactérias (SU et al., 2012). Também segundo Murray; Rosenthal; Pfaller (2009) *Staphylococcus aureus* utilizam um aminoácido ponte

(p.ex. glicina) para aumentar a ligaçao cruzada. O peptideoglicano em bactérias Gram positivas forma múltiplas camadas e é frequentemente ligado cruzadamente em 3 dimensões garantindo uma parede celular muito forte e rígida.

Os resultados deste trabalho mostram também que a atividade antimicrobiana não depende somente a composição de aminoácidos e de prováveis grupos sulfidrilas, mas também a sequência em que se encontram esses aminoácidos. Segundo Yike et al. (2006) os peptidos bioativos contêm usualmente 3-20 resíduos de aminoácidos e a sua atividade é baseada na sua composição em aminoácidos e da sequência. O mesmo verificado por Yang et al. (2013) caracterizaram 29 diferentes precursores de peptídeos antimicrobianos a partir da pele de *Hylarana spinulosa*, e mostrou que diferentes famílias de peptídeos antimicrobianos exibiram diferentes espectros de atividade antimicrobiana, devido as suas diferentes estruturas primárias. Por exemplo, brevinin-1SN2 exibe atividade antimicrobiana de largo espectro contra todos os micro-organismos testados, incluindo *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* 981 (IS), *Nocardia asteroides* 201118 (IS), *Pseudomonas aeruginosa* (CGMCC 1.50), *Klebsiella pneumoniae* 08040724 (IS), *Enterobacter cloacae* (CGMCC 1.57), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Psychrobacter faecalis* X29 (IS), *Candida glabrata* 090902 (IS), *Candida albicans* (ATCC 10231). No entanto, spinulosain-A1 não mostra nenhuma atividade antimicrobiana contra os micro-organismos testados. Além disso, os peptídeos antimicrobianos a partir de uma mesma família, também exibiram diferentes atividades. Embora a familia tenha estrutura semelhante, à atividade antimicrobiana do brevinin-2SN1 e brevinin-2SN2 foram diferentes de brevinin-2SN3 e brevinin-2SN4. Fieck et al. (2010) testaram seis peptídeos antimicrobianos, apidaecin, magainina II, melitina, cecropina A e verificaram que a concentração mínima inibitória (CMI) depende do peptídeo e da bactéria testada, sendo que a Penaeidina não teve efeito sobre nenhuma bactéria. A melitina mostrou inibição para *Rhodococcus rhodnii* a uma concentração mais baixa do que a necessária para a *Escherichia coli*. A concentração mínima inibitória (CMI) para estes peptídeos contra *E. coli* variou de 10 nM para a magainina II e 10 µM para melitina.

Seo et al. (2014) também verificaram que um peptídeo antimicrobiano de 3,4 kDa, purificado a partir de um extrato de pele de atum (*Katsuwonus pelamis*), apresentou atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas, tais como *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, e *Streptococcus iniae*, com concentrações mínimas eficazes (CME) entre 1,2 e 17,0 µg/mL e bactérias Gram-negativas, tais como *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli* D31 e *Vibrio parahaemolyticus*, CME entre 3,1 e 12,0 µg/mL) e contra *Cândida albicans* (CME, 16,0 µg/mL).

# 6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos neste trabalho pode-se concluir que foi possível utilizar um isolado proteico proveniente da carne mecanicamente separada de corvina como substrato para o processo de hidrólise enzimática para as 3 enzimas testadas, sendo que a enzima Protamex apresentou maiores valores de grau de hidrólise (30,5%) seguido das enzimas Alcalase (6,0%) e Flavourzyme (5,9%).

Os ossos desmineralizados de corvina também demostraram ser bom substrato para o processo de hidrólise enzimática, sendo que a enzima Protamex apresentou maior afinidade pelo substrato obtendo maior grau de hidrólise (21,5%), quando comparado com as enzimas Alcalase (14,7%) e Flavourzyme (15,5%).

A enzima Protamex, mostrou maior afinidade pelos dois substratos IP e OD, onde foram alcançados os maiores valores de GH, já as enzimas Alcalase e Flavourzyme demostraram maior afinidade pelo substrato OD, com grau de hidrólise superior quando comparado como o substrato IP, apesar o IP ser um substrato com menos interferentes (como: lipídeos, cinzas) para a reação de hidrólise em relação aos OD.

As frações maiores que 3 kDa que apresentaram maior conteúdo de grupamento –SH, mostraram atividade antimicrobiana e antioxidante.

A fração proteica (FP9) obtida pelo processo de hidrólise com a enzima Protamex, utilizando com substrado os ossos desmineralizados de corvina (OD), apresentou atividade antioxidante, diminuindo a concentração de espécies reativas de oxigênio em cultura de hepatócitos de zebrafish, mostrando que o conteúdo de grupos SH parece estar relacionado com a diminuição da concentração de espécies rativas de oxigênio nas células.

Alguns hidrolisados obtidos apresentaram atividade antimicrobiana para as duas bactérias testadas (*S.* Enteritidis *e S.* coagulase positiva), mostrando maior zona de inibição contra o *S.* coagulase positiva, sendo que a inibição das colônias não foi total, diferente da *S.* Enteritidis, onde a zona de inibição foi menor, mas houve uma ausência maior da colonias microbianas no halo.

# 7 PERSPECTIVAS

- Analisar o perfil de aminoácidos presentes nas frações peptídicas a fim de avaliar a presença de grupos SH em relação ao conteúdo de cisteina;
- Determinar a concentração de glutationa nas células de hepatócitos de zhebrafish, para analisar sua relação com a diminuição de espécies reativas de oxigênio;
- Verificar o aumento de células natural killer (NK), para avaliar a influencia da glutationa no aumento da resposta imunológica;
- Purificar e identificar as frações peptídicas que apresentaram atividade antioxidante e antimicrobiana.

# 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

ALMEIDA, H. O. **Identificação de peptídeos antimicrobianos de folhas de berinjela para o controle de patógenos de plantas.** 2007. 128p. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

AHN, C. B.; KIM, J. G.; JE, J. Y. Purification and antioxidant properties of peptide from salmon byproduct protein hydrolysate by gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, v. 147, p. 78–83, 2014.

ALFARO, A.T.; COSTA, C. S. G.; FONSECA, G.; PRENTICE-HERNÁNDEZ C. Effect of extraction parameters on the properties of gelatin from King Weakfish (*Macrodon ancylodon*) bones. **Food Science and Technology International**, v. 15, n. 6, p. 553-562, 2010.

AOAC. 2000. **Official Method of Analysis of AOAC** Intl. 17th ed. Association of Official Analytical Communities, Arlington, VA, USA.

BADOLATO, E. S. G.; CARVALHO, J. B.; MELLO, M. R. P. A.; TAVARES, M.; CAMPOS, N. C.; AUED-PIMENTEL, S.; MORAIS, C. composição centesimal, de ácidos graxos e valor calórico de cinco espécies de peixes marinhos nas diferentes estações do ano. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 54, n. 1, p. 27-35, 1994.

BATTISON, A. L.; SUMMERFIELD, R.; PATRZYKAT, A. Isolation and characterization of two antimicrobial peptides form haemocytes of the American lobster Homarus americanus. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 25, p. 181-187, 2008.

BERG, L. V. D. **Development of 2nd generation proteinous bioplastics**. 2009. 149 p. Dissertação (Master of Science in Biotechnology), University Waikato, New Zealand, 2009.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta, **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

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

BORGES, A.; TEIXEIRA, M. S.; FREITAS, M. Q.; FRANCO, R. M.; MÁRSICO, E. T.; SÃO CLEMENTE, S. C. Qualidade da corvina (*Micropogonias furnieri*) eviscerada em diferentes períodos de estocagem a 0°C. **Ciência Rural**, v. 37, n. 1, p. 259-264, 2007.

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

BRASIL 2010, Boletim estatistico da pesca e aquicultura.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) - Ministério da Saúde. Resolução n. 2, de 7 de janeiro de 2002. **Regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedade funcional ou de saúde**. Publicada no Diário Oficial da União, Brasília, 17 de julho 2002. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/02_02rdc.htm. Acesso em: 08/05/2013.

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

CENTENARO, G. S. **Obtenção de biopeptídeos com atividade antioxidante a partir de proteínas de origem animal**. 2011. 158 p. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2011.

CENTENARO, G. S.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C.; SALAS-MELLADO, M. Efeito da concentração de enzima e de substrato no grau de hidrólise e nas propriedades funcionais de hidrolisados proteicos de corvina (*Micropogonias furnieri*). **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1792-1798, 2009.

CHEN, M.; LI, B. The effect of molecular weights on the survivability of casein-derived antioxidant peptides after the simulated gastrointestinal digestion, **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 16, p. 341–348, 2012.

CLEMENTE, A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. **Trends in Science & Technology**, v. 11, p. 254-262, 2000.

CLSI. (2003). **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test.** Document M2-A8. Clinical laboratory Standards Institute. Approved Standard e Eight Edition. 23(1)b.

CORTEZ-VEGA, W. R. **Desenvolvimento de filmes nanocompósitos de isolado proteico de corvina (*Micropogonias furnieri*) e argila organofílica.** 2011. 148 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Ciência de Alimentos)- Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2011.

COSTA, C. L. A.; CHAVES, I. S.; VENTURA-LIMA, J.; FERREIRA, J. L. R.; FERRAZ, L.; CARVALHO, L. M.; MONSERRAT, J. M., In vitro evaluation of co-exposure of arsenium and an organic nanomaterial (fullerene, $C_{60}$) in zebrafish hepatocytes, **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 155, p. 206–212, 2012.

COSTA, P. G.; FONTANA, A.; VEIGA, I.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Caracterização funcional e nutricional de um isolado proteico obtido a partir de resíduos de camarão rosa (*Farfantepenaeus paulensis*). **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v.18, n.1, p.7-18, 2007.

DEVLIEGHERE, F.; VERMEIREN, L.; DEBEVERE, J. New preservation technologies: Possibilities and limitations. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 273−285, 2004.

DONG, S.; ZENG, M.; WANG, D.; LIU, Z.; ZHAO, Y.; YANG, H. Antioxidant and biochemical properties of protein hydrolysates prepared from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). **Food Chemistry**, v. 107, p. 1485–1493, 2008.

DUAN, X.; OCEN, D.; WU, F.; LI, M.; YANG, N.; XU, J.; CHEN, H.; HUANG, L.; JIN, Z.; XU, X. Purification and characterization of a natural antioxidant peptide from fertilized eggs, **Food Research International**, v. 56, p. 18–24, 2014.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β-caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH•. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.

ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups, **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 82, p. 70-77, 1959.

ELSDON, T. S.; GILLANDERS B. M. Interactive effects of temperature and salinity on otolith chemistry: challenges for determining environmental histories of fish. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences,** v. 59, n. 11, p. 1796-1808, 2002.

ERDMANN, C; CHEUNG, B. W. Y.; SCHRÖDER, H. The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 19, p. 643–654, 2008.

FIECK, A.; HURWITZ, I.; KANG, A. S.; DURVASULA, R. *Trypanosoma cruzi*: Synergistic cytotoxicity of multiple amphipathic anti-microbial peptides to *T. cruzi* and potential bacterial hosts. **Experimental Parasitology**, v. 125, p. 342–347, 2010.

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

FONTANA, A.; CENTENARO, G. S.; PALEZI, S. C.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Obtenção e avaliação de concentrados proteicos de corvina (*Micropogonias furnieri*) processados por extração química. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2299-2303, 2009.

FONTANARI, G. G.; JACON, M. C.; PASTRE, I. A.; FERTONANI, F. L.; NEVES, V. A.; BATISTUTI, J. P. Isolado proteico de semente de goiaba (*Psidium guajava*): caracterização de propriedades funcionais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 73 - 79, 2007.

FORMAN, H. J.; RINNA, A.; ZHANG H. Glutathione: Overview of its protective role, measurement, and biosynthesis. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 30, p. 1-12, 2009.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**, São Paulo: Atheneu, 2008, 176 p.

FREITAS I. R. **Recuperação das proteínas provenientes de pescado utilizando o processo de variação de pH.** 2012. 97 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2012.

FROTA, K.M.G. **Efeito do feijão Caupi (*Vigna unguiculata L. Walp)* e da proteína isolada no metabolismo lipídico em Hamster (*Mesocricetus auratus*) hipercolesterolemizados**. 2007. 136 p. Dissertação (Mestrado em Nutrição Humana Aplicada) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

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

GIULIANI, A.; PIRRI, G.; NICOLETTO, S. Antimicrobial peptides: An overview of a promising class of therapeutics. **Central European Journal of Biology**, v. 2, p. 1–33, 2007.

GONÇALVES, A. A.; PASSOS, M. G. Uso da enzima trasnsglutaminase na elaboração de um produto reestruturado à base de peixe. **Revista da Carne**, v. 3, p. 72-76, 2003.

GOSSET, P. W.; RIZVI, S. S. H.; BAKER, R. C. Qualitative analysis of gelation in egg protein systems. **Food Technology**, v. 38, n. 5, p. 67-74, 1984.

GOW, A. J.; ISCHIROPOULOS, H. J. Nitric oxide chemistry and cellular signaling. **Journal of Cellular Physiology**, v. 187, p. 277–282, 2001.

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

GUIMARÃES, J. L.; ADELL, E. A.; FELÍCIO, P. E. Estrutura e composição do músculo e tecidos associados. **Apostila do Laboratório de Carnes**, DTA-FEA-UNICAMP, 1995.

GÜLÇIN, Ï. Antioxidant properties of resveratrol: A structure-insight. **Innovative Food and Emerging Technologies,** v. 11, p. 210–218, 2010.

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

HANCOCK, R. E. W. Cationic peptides: Effectors in innate immunity and novel antimicrobials. **The Lancet Infectious Diseases**, v.1, p.156–164, 2001.

HANCOCK, R. E. W. Concerns regarding resistance to self-proteins. **Microbiology**, v. 149, p. 3343-3344, 2003.

HANCOCK, R. E. W.; CHAPPLE, D. S. Peptides antibiotics. **Antimicrobial Agents Chemother**, v. 43, p. 1317-1323, 1999.

HARNEDY, P. A.; FITZGERALD, R. J. Bioactive peptides from marine processing waste and shellfish: A review. **Journal of Functional Foods**, v. 4, p. 6 – 24, 2012.

HARTMANN, R.; MEISEL H. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, p. 163-169, 2007.

HAYES, M.; ROSS, R. P.; FITZGERALD, G. F.; HILL, C.; STANTON C. Casein-Derived Antimicrobial Peptides Generated by *Lactobacillus acidophilus* DPC6026. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 3, p. 2260–2264, 2006.

HE, R.; JU, X.; YUAN, J.; WANG, L.; GIRGIH, A. T.; ALUKO, R. E. Antioxidant activities of rapeseed peptides produced by solid state fermentation, **Food Research International**, v. 49, p. 432–438, 2012.

HÖEHR, N. F.; JÚNIOR, L. R.; KUBOTA, L. T. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutationa associado a métodos electroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 112-119, 2001.

HUANG, G.; REN, L.; JIANG, J. Purification of a histidine-containing peptide with calcium binding activity from shrimp processing byproducts hydrolysate, **European Food Research and Technology**, 2010. DOI 10.1007/s00217-010-1388-2.

HUANG, S.; CHEN, K.; CHEN, Y.; HONG, W.; CHEN, M. Immunomodulatory properties of the milk whey products obtained by enzymatic and microbial hydrolysis, **International Journal of Food Science & Technology**, v. 45, n. 5, p. 1061–1067, 2010.

IBRAHIM, H. R.; SUGIMOTO, Y.; AOKI, T. Ovotransferrin antimicrobial peptide (OTAP-92) kills bacteria through a membrane damage mechanism, **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1523, p. 196–205, 2000.

Internet: ambientebrasil. http://ambientes.ambientebrasil.com.br in 2011/03/21.

Internet: Novozymes. Products and solutions – Protamex®. http://www.novozymes in 2012/05/12.

JE, J.; LEE, K.; LEE, M. H.; AHN, C. Antioxidant and antihypertensive protein hydrolysates produced from tuna liver by enzymatic hydrolysis. **Food Research International**, v. 42, p. 1266–1272, 2009.

JE, J.; QIAN, Z.; BYUN, H.; KIM, S. Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 840–846, 2007.

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

JUNG, W.; KIM, S. Calcium-binding peptide derived from pepsinolytic hydrolysates of hoki (*Johnius belengerii*) frame. **European Food Research and Technology**, v. 224, p. 763–767, 2007.

KALN, R. J; CHEN, Z.; SONDA, T. S. ABU-KPAW, J.C. Study on the effects of control variables on the extraction of peanut protein isolates from peanut meal *(Arachies hypogaea L.*). **American Journal of Food Technology**. v. 4, p. 47-55, 2009.

KARI, G.; RODECK, U.; DICKER, A. P. Zebrafish: An emerging model system for human disease and drug discovery. **Clinical Pharmacolology and Therapeutis**, v. 82, n.1, p. 70-80, 2007.

KONG, X.; GUO, M.; HUA, Y.; CAO, D.; ZHANG, C. Enzymatic preparation of immunomodulating hydrolysates from soy proteins, **Bioresource Technology,** v. 99, n. 18, p. 8873-8879, 2008.

KRISTINSSON, H.; RASCO, B. A. Fish protein hydrolisates: production, biochemical, and functional properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 40, n. 1, p. 43-81, 2000.

LEE, C. C.; MACKAY, J. A.; FRÉCHET, J. M. J.; SZOKA, F. C. Designing dendrimers for biological applications. **Nature Biotechnology**, v. 23, p. 1517-1526, 2005.

LEE, S.; CHEONG, S. H;, KIM, Y;, HWANG, J.; KWON, H.; KANG, S.; MOON, S.; JEON, B.; PARK, P. Antioxidant activity of a novel synthetic hexa-peptide derived from an enzymatic hydrolysate of duck skin by-products. **Food and Chemical Toxicology**, v. 62, p. 276–280, 2013.

LEONHARDT, J. H.; FILHO, M. C.; FROSSARD, H.; MORENO, A. M. Características morfométricas, rendimento e composição do filé de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, da linhagem tailandesa, local e do cruzamento de ambas, **Semina: Ciências Agrárias**, v. 27, n. 1, p. 125-132, 2006.

LEQUEUX, I.; DUCASSE, E.; JOUENNE, T.; THEBAULT, P. Addition of antimicrobial properties to hyaluronic acid by grafting of antimicrobial peptide. **European Polymer Journal**, v. 51, p. 182–190, 2014.

LI, B.; CHEN, F.; WANG, X.; JI, B.; WU, Y. Isolation and identification of antioxidative peptides from porcine collagen hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. **Food Chemistry,** v. 102, n. 4, p. 1135–43, 2007.

LIESCHKE, J.G.; CURRIE, P.D. Animal models of human disease: Zebrafish swim into view. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, n. 5, p. 353-367, 2007.

LIN, C. C.; LIANG, J. H. Effect of antioxidants on the oxidative stability of chicken breast meat in a dispersion system. **Journal of Food Science**, v. 67, p. 530-533, 2002.

LOMAESTRO, B.; MALONE, M.; Glutathione in health and disease: Pharmacotherapeutic Issues. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 29, n. 12, p. 1263-1273, 1995.

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

LU, S. C. Regulation of glutathione synthesis. **Molecular Aspects of Medicine,** v. 30, p. 42-49, 2009,

MANAB, A.; SAWITRI, M. E.; ALAWWALY, K. U.; PURNOMO, H. Antimicrobial activity of whey protein based edible film incorporated with organic acids. **African Journal of Food Science**, v. 5, n. 1, p. 6-11, 2011.

MARCUSE, R. Antioxidant effect of amino acids. **Nature**, v. 186, p. 886–887, 1960.

MARQUES, P.R.B.O.; YAMANAKA, H. Biossensores baseados no processo de inibição enzimática. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1791-1799, 2008.

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

MATSUSHITA, S.; KOBAYASHI, M.; NITTA, Y. Inactivation of enzymes by linoleic acid hydroperoxides and linoleic acid. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 34, p. 817–824, 1970.

MEISEL, H. Multifunctional peptides encrypted in milk proteins. **Biofactors**, v. 21, p. 55-61, 2004.

MEMARPOOR-YAZDI, M.; ASOODEH, A.; CHAMANI, J. A novel antioxidant and antimicrobial peptide from hen egg white lysozyme hydrolysates. **Journal of Functional Foods,** v. 4, n. 1, p. 278–286, 2012.

MENEZES B. S. **Obtenção e avaliação de filmes nanocompósitos antimicrobianos com isolado protéico de frango e nanoargilas.** 2014. 84 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2014.

MIRA, N. V. M.; MARQUEZ, U. M. L. Importância do diagnóstico e tratamento da fenilcetonúria. **Revista de Saúde Pública**, v. 34, n. 1, p. 86-96, 2000.

MIRET, S.; GROENE, E. M.; KLAFFKE, W. Comparison of in vitro assays of cellular toxicity in the human hepatic cell line HepG2. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 11, p. 184–193, 2006.

MÖLLER, N. P.; SCHOLZ-AHRENS, K. E.; ROOS, N.; JÜRGEN, S. Bioactive peptides and proteins from foods: Indication for health effects. **European Journal of Nutrition**, v. 47, n. 4, p. 171–182, 2008.

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

MUKHERJEE, P. K.; WIEST, A.; RUIZ, N.; KEIGHTLEY, A.; MORAN-DIEZ, M. E.; MCCLUSKEY, K.; POUCHUS, Y. F.; KENERLEY, C. M. Two classes of new peptaibols

are synthesized by a single non-ribosomal peptide synthetase of *Trichoderma virens*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 6, p. 4544–4554, 2011.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009, 948 p.

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

NETO, A. S. S. R. **Glutationa em defesa antioxidante, regulação de morte celular programada e destoxificação de drogas**. 2010. 77 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Fernando Pessoa, Faculdade Ciências da Saúde, Porto, 2010.

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

NOLSØE, H.; UNDELAND, I. The acid and alkaline solubilization process for the isolation of muscle proteins: state of the art. **Food Bioprocess Technology**, v. 2, p. 621–627, 2009.

OETTERER, M.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B.; SPOTO, M. H. F. 2006. **Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos, Proteínas do pescado – processamentos com intervenção na fração protéica**, Ed. Manole, Barueri, SP, p. 612.

ORDÓÑEZ, J. A. **Tecnologia de Alimentos – Alimentos de origem animal, vol. 2**, Porto Alegre: Artmed, R. S., 2005, 280 p.

OSTBERG, J. E.; ATTAR, M. J.; MOHAMED-ALI, V.; CONWAY, G. S. Adipokine dysregulation in turner syndrome: Comparison of circulating interleukin-6 and leptin concentrations with measures of adiposity and C-reative protein. **The Journal Clinical Endocrinology Metabolism**, v. 90, n. 5, p. 2948-2953, 2005.

OVISSIPOUR, M.; TAGHIOF, M.; MOTAMEDZADEGAN, A.; RASCO, B.; MOLLA, A. E. Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of beluga sturgeon *Huso huso* using Alcalase. **International Aquatic Research**, v. 1, p. 31-38, 2009.

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

PACHECO, M. T. B.; BIGHETTI, E.; ANTONIO, M.; CARVALHO, J. E.; ROSANELI, C. F.; SGARBIERI, V. C. Efeito de um hidrolisado de proteínas de soro de leite e de seus peptídeos na proteção de lesões ulcerativas da mucosa gástrica de ratos. **Revista de Nutrição**, v. 19, n. 1, p. 47-55, 2006.

PACHECO, M. T. B.; DIAS, N. F.G.; BALDINI, V. L. S.; TANIKAWA C.; SGARBIERI V. C. Propriedades funcionais de hidrolisados obtidos a partir de concentrados proteicos de soro de leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 2, p. 333-338, 2005.

PAGANO, G.; KORKINA, L. G.; BRUNK, U. T.; CHESSA, L.; DEGAN, P.; DEL PRINCIPE, D.; KELLY, F. J.; MALORNI, W.; PALLARDÓ, F.; PASQUIER, C.; SCOVASSI, I.; ZATERRALLE, A.; FRANCESCHI, C. Congenital disorders sharing oxidative stress and cancer proneness as phenotypic hallmarks: prospects for joint research in pharmacology. **Medical Hypothesis**, v. 51, p. 253-266, 1998.

PANYAM, D.; KILARA, A. Enchanting the functionality of food proteins by enzymatic modification. **Trends in Food Scieence and Technology**, v.7, n.4, p. 120-125, 1996.

PAPALEO, V. T. **As propriedades da proteína de soja na alimentação humana**. Brasília: UnB/CET, 2004. **Monografia** Qualidade em Alimentos - Universidade de Brasília, Centro de Excelência em Turismo, 2004.

PENG, X. Y.; XIONG, Y. L.; KONG, B. H. Antioxidant activity of peptide fractions from whey protein hydrolysates as measured by electron spin resonance. **Food Chemistry**, v. 113, p. 196–201, 2009.

PEREIRA, I. O. **Análise e otimização do processo de ultrafiltração do soro de leite para produção de concentrado proteico**. 2009. 62 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetingal, 2009.

PETERS, B. M.; SHIRTLIFF, M. E.; JABRA-RIZK, M. A. Antimicrobial peptides: Primeval molecules or future drugs? **Plos Pathogens**, v. 6, n. 10, p. 1-4, 2010.

PHELAN, M.; AHERNE, A.; FITZGERALD, R. J.; O'BRIEN, N. M. Casein-derived bioactive peptides: Biological effects, industrial uses, safety aspects and regulatory status. **International Dairy Journal**, v. 19, p. 643–654, 2009.

PIHLANTO, A. Antioxidative peptides derived from milk proteins. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 1306–1314, 2006.

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

POWELL, T. H.; HUNT, M. C.; DIKEMAN, M. E. Enzymatic assay to determine collagen thermal desnaturation and solubilization. **Meat Science**, v. 54, p. 307–311, 2000.

PUCHALSKA, P.; MARINA, M. L.; GARCÍA, M. C. Isolation and identification of antioxidant peptides from commercial soybean-based infant formulas. **Food Chemistry**, v. 148, p. 147–154, 2014.

RAI, A. K.; SWAPNA, H. C.; BHASKAR, N.; HALAMI, P. M.; SACHINDRA, N. M. Effect of fermentation ensilaging on recovery of oil from fresh water fish viscera. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, p. 9-13, 2010.

RAJAPAKSE, N.; MENDIS, E.; JUNG, W.K.; JE, J.Y.; KIM, S.K. Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidative properties. **Food Research International**, v. 38, p. 175–182, 2005.

REDDY K. V., YEDERY R. D., ARANHA C., Antimicrobial peptides: premises and promises. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 24, p. 536-547, 2004.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radicals in Chemistry**, **Biology and Medicine**, v. 26, p. 1231-1237, 1999.

REN, J.; ZHAO, M.; SHI, J.; WANG, J.; JIANG, Y.; CUI, C.; KAKUDA, Y.; XUE, S. J. Purification and identification of antioxidant peptides from grass carp muscle hydrolysates by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 108, p. 727–736, 2008.

ROCHA, M. **Avaliacao da atividade antimicrobiana de filmes proteicos a base de anchoita (*Engraulis anchoita)* incorporados com acidos orgânicos.** 2012. 161 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2012.

ROCHA, M.; LOIKO, M. R.; TONDO, E. C.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Physical, mechanical and antimicrobial properties of Argentine anchovy (*Engraulis anchoita*) protein films incorporated with organic acids. **Food Hydrocolloids**, v. 37, p. 213–220, 2014.

ROESLER, R.; MALTA, L. G.; CARRASCO, L. C.; HOLANDA, R. B.; SOUSA, C. A. S.; PASTORE, G. M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n.1, p. 53-60, 2007.

ROMERO, F. J.; GARCÍA, L. A.; SALAS, J. A.; DÍAZ, M.; QUIRÓS, L. M. Production, purification and partial characterization of two extracellular proteases from *Serratia marcescens* grown in whey. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 507-515, 2001.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZJIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS•+. Embrapa Agroindústria Tropical. **Comunicado Técnico 128,** ISSN 1679-6535, 1ª edição *on line*: julho de 2007.

SÁNCHEZ, D.; KASSAN, M.; CONTRERAS, M. M.; CARRÓN, R.; RECIO, I.; MONTERO, M.; SEVILLA M. Long-term intake of a milk casein hydrolysate attenuates the development of hypertension and involves cardiovascular benefits. **Pharmacological Research**, v. 63, p. 398–404, 2011.

SANTOS, S. D.; MARTINS V. G.; SALAS-MELLADO M.; PRENTICE-HERNÁNDEZ C. Otimização dos parâmetros de produção de hidrolisados protéicos enzimáticos utilizando pescado de baixo valor comercial. **Química Nova**, v.32 n.1, 2009.

SARMA, A. D.; SHARMA, R. Anthocyanin-DNA copigmentation complex: mutual protection against oxidative damage. **Phytochemistry**, v. 52, p. 1313-1318, 1999.

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

SATHIVEL, S. Functional and nutritional-enhancing protein isolates from Arrowttoth Flounder. **Annual Meeting – Chicago.** University of Alaska. Chicago, 2003.

SCHAFER, F. Q.; BUETTNER, G. R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 30, n. 11, p. 1191–1212, 2001.

SCHMIDL, M. K.; TAYLOR, S. L.; NORDLEE, J. A. Use of hydrolysate-based products in special medical diets. **Food Tecnology**. V. 48, n. 0, p. 77-85, 1994.

SENTANDREU, M. A.; TOLDRÁ, F. A rapid, simple and sensitive fluorescence method for the assay of angiotensin-I converting enzyme. **Food Chemistry**, v. 97, p. 546–554, 2006.

SEO, J.; LEE, M. J.; GO, H.; KIM, Y. J.; PARK N. G. Antimicrobial function of the GAPDH-related antimicrobial peptide in the skin of skipjack tuna, *Katsuwonus pelamis*, **Fish & Shellfish Immunology**, v. 36, p. 571-581, 2014.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos proteicos: Propriedades, Degradações e Modificações**. 1 ed. São Paulo: Livraria Varela, 1996, 520 p.

SHIMADA, K.; CHEFTEL, J. C. Determination of sulfhydryl groups and disulfide bonds in heat-induced gels of soy protein isolate. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, v. 37, n.1, p. 161-168, 1989.

SIES, H. Glutathione and its role in celular functions. **Free Radical Biology & Medicine**, n. 9, v. 27, p. 916-920, 1999.

SIGMA. **Quality control test procedure**, product information, SSCASE01.001, 1999.

SKIERKA, E.; SADOWSKA, M.; KARWOWSKA, A. Optimization of condition for demineralization Baltic Cod (*Gadus morhua*) backbone, **Food Chemistry**, v. 105, p. 215–218, 2007.

SLIZYTE, R.; DAUKSAS, E.; FALCH, E.; STORRØ, I.; RUSTAD, T. Yield and composition of different fractions obtained after enzymatic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) byproducts. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1415-1424, 2005.

SOUZA, E. C. G.; MIRANDA, L. C. G.; NAGEM, T. J.; OLIVEIRA, T. T.; COSTA, N. M. B.; QUEIROZ, M. E. L. R.; NEVES, A. A.; REZENDE, J. L. M. Síntese e caracterização nutricional da plasteína obtida da proteína da folha de mandioca, da soja e do soro de queijo. **Revista Ceres**, v. 47, n. 269, p. 9–20, 2000.

SOUZA, M. L. R.; MARANHÃO, T. C. F. Rendimento de carcaça, filé e subprodutos da filetagem da tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (L), em função do peso corporal, **Acta Scientiarum**, v. 23, n. 4, p. 897-901, 2001.

StatSoft, **Inc. STATISTICA** (data analysis software system), version 7 for *Windows*. www.statsoft.com. 2004.

SU, H.; CHEN, Z.; SONG, X.; CHEN, X.; SHI, M.; ZHOU, B.; ZHAO, X.; ZHANG, Y. Antimicrobial peptide trichokonin vi-induced alterations in the morphological and nanomechanical properties of *Bacillus subtilis*. **Plos One**, v. 7, n. 9, p. 1-10, 2012.

SUN, T.; TANUMIHARDJO, S. A. An integrated approach to evaluate food antioxidant capacity. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 9, p. 159-65, 2007.

TAKEITI, C. Y. **Influência do tratamento térmico nas propriedades funcionais de isolados proteicos de soja e de seus hidrolisados enzimáticos**. 2002. 102 p. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2002.

TANAKA, K.; NISHIZONO, S.; KUGINO, K.; TAMARI, M.; KURUMIYA, M.; ABE, N.; IKEDA, I. Effect of dietary oyster extract on lipid metabolism, blood pressure, and blood glucose in SD rats, hypertensive rats, and diabetic rats. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 70, n. 2, p. 462-470, 2006.

TASKAYA, L.; CHEN, Y. C.; JACZYNSKI, J. Functional properties of proteins recovered from whole gutted silver carp (Hypophthalmichthys molitrix) by isoelectric solubilization/precipitation. **Food Science and Technology**, v. 42, p. 1082–1089, 2009.

TASKAYA, L.; JACZYNSKI, J. Flocculation-enhanced protein recovery from fish processing by-products by isoelectric solubilization/precipitation, **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, p. 570–575, 2009.

THAKAR, P. N.; PATEL, J. R.; JOSHI, N. S. Protein hydrolisates: a rewiew. **Indian Journal of Dairy Science**, v. 44, n.9, 557, 1991.

THIANSILAKUL, Y.; BENJAKUL, S.; SHAHIDI, F. Compositions, functional properties and antioxidative activity of protein hydrolysates prepared from round scad (*Decapterus maruadsi*), **Food Chemistry**, v. 103, p. 1385–1394, 2007.

TING, C.-H.; HUANG, H.-N.; HUANG, T.-C.; WU, C.-J; CHEN, J.-Y. The mechanisms by which pardaxin, a natural cationic antimicrobial peptide, targets the endoplasmic reticulum and induces c-FOS. **Biomaterials**, v. 35, p. 3627-3640, 2014.

TORRES, M. R.; MARÍN, F. R.; RAMOS, A. J.; SORIANO, E. Study of operating conditions in concentration of chicken blood plasma proteins by ultrafiltration, **Journal of Food Engineering**, v. 54, p. 215–219, 2002.

TOSSI, A.; SANDRI, L.; GIANGASPERO, A. Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides, **Biopolymers**, v. 55, p. 4-30, 2000.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; BENFATO, V. M.; SILVEIRA, M.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação, **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VIEIRA, P. C.; HAIMOVICI M. Idade e crescimento da pescada-olhuda *Cynoscion striatus* (Pisces, Scianidae) no sul do brasil, **Atlântica**, v. 15, p. 73-91, 1993.

WANG, D.; WANG, L.; ZHU, F.; CHEN, X. D.; ZOU, L.; SAITO, M.; Li, L. In vivo and in vitro studies on the antioxidant activities of the aqueous extracts of Douchi (a traditional Chinese salt-fermented soybean food). **Food Chemistry**, v. 107, p. 1421–1428, 2008.

WANG, J.; WANG, K.; LIN, S.; ZHAO, P.; JONES, G.; TRANG, H.; LIU, J.; YE, H. Improvement of antioxidant activity of peptides with molecular weights ranging from 1 to 10 kDa by PEF technology, **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, p. 244– 249, 2012.

WHITAKER, J. R.; VORAGEN, A. G. J.; WONG, D. W. S. **Handbook of food enzymology**, ed. Marcel Dekker, Inc., New York, p. 1052, 2003.

WHITMORE, L.; WALLACE, B. A. Analysis of peptaibol sequence composition: implications for in vivo synthesis and channel formation. **European Biophysics Journal**, v. 33, n. 3, p. 233–237, 2004.

WU, M.; MAIER, E.; BENZ, R; HANCOCK, R. E. W. Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. **Biochemistry**, v. 38, p. 7235–7242, 1999.

WU, Y.; TIAN, Q.; LI, L.; KHAN, M. N.; YANG, X.; ZHANG, Z.; HU, X.; CHEN, S. Inhibitory effect of antioxidant peptides derived from *Pinctada fucata* protein on ultraviolet-induced photoaging in mice, **Journal of Functional Foods**, v. 5, p. 527 –538, 2013.

YANG, X.; HU, Y.; XU, S.; HU, Y.; MENG, H.; GUO, C.; LIU, Y.; LIU, J.; YU, Z.; WANG, H. Identification of multiple antimicrobial peptides from the skin of fine-spined frog, *Hylarana spinulosa* (*Ranidae*), **Biochimie**, v. 95, p. 2429-2436, 2013.

YEAMAN, M. R.; YOUNT, N. Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance, **Pharmacological Reviews**, v. 55, p. 27–55, 2003.

YEUNG, A. T.; GELLATLY, S. L.; HANCOCK R. E. Multifunctional cationic host defencepeptides and their clinical applications. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 68, p. 2161–2176, 2011.

YIKE, I.; DISTLER, A. M.; ZIADY, A. G.; DEARBORN, D. G. Mycotoxin adducts on human serum albumin: biomarkers of exposure to *Stachybotrys chartarum*. **Environmental Health Perspectives**, v. 114, n. 8, p. 1221-6, 2006.

YONGSAWATDIGUL, J.; PARK, J. W. Effects of alkali and acid solubilization on gelation characteristics of rockfish muscle proteins, **Journal of Food Science**, v. 69, n.7, p. 499-505, 2004.

ZACCHINO, S.; SANTECCHIA, C.; LÓPEZ, S.; GATTUSO, S.; MUNOZ, J.; CRUANES, A.; VIVOT, E.; CRUANES M.; SALINAS, A.; RUIZ, R. *In vitro* antifungal evaluation and studies on the mode of action of eight selected from the argentine flora. **Phytomedicine**, v. 5, p. 389-395, 1998.

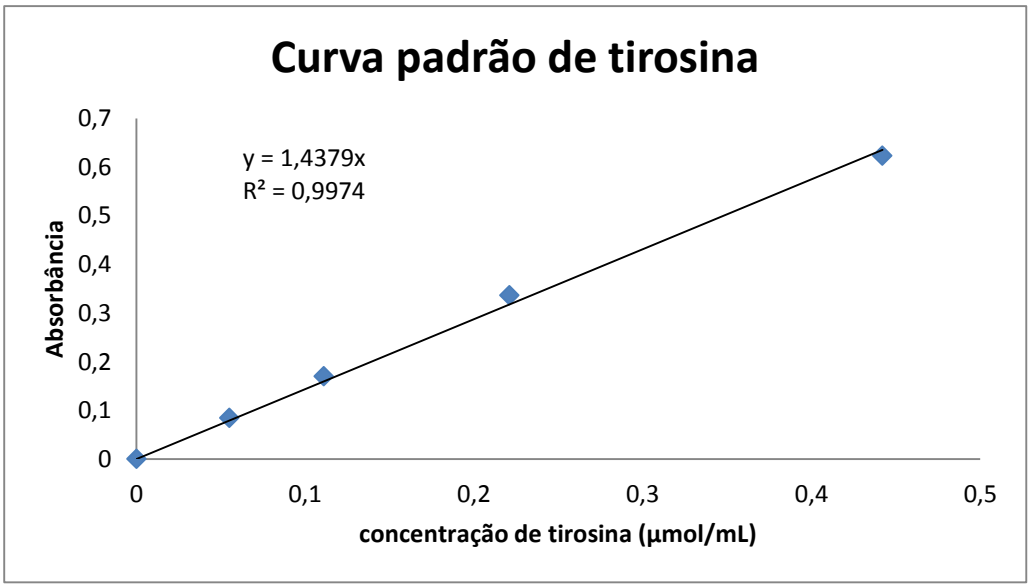
ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, v. 415, p. 389–395, 2002.

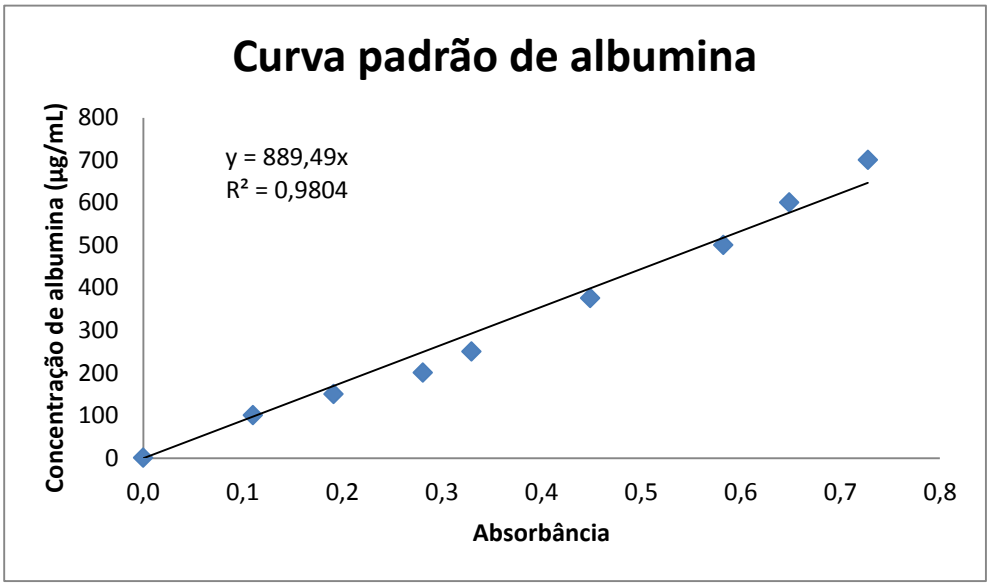
ZAVAREZE, E. R.; SILVA, C. M.; SALAS-MELLADO, M.; PRENTICE-HERNÁNDEZ C. Funcionalidade de hidrolisados proteicos de Cabrinha (*Prionotus punctatus*) obtidos a partir de diferentes proteases microbianas, **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1739-1743, 2009.

ZIEGLER, F. L. F.; SGARBIERI, V. C. Caracterização químico-nutricional de um isolado proteico de soro de leite, um hidrolisado de colágeno bovino e misturas dos dois produtos. **Revista de Nutrição**, v. 22, n.1, p. 61-70, 2009.

# APÊNDICE 1

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



# APÊNDICE 2

Curva padrão de albumina, utilizada no cálculo da quantidade de proteína da enzima, para obtenção da atividade proteolítica específica.