



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

OBTENÇÃO DE BIOPEPTÍDEOS COM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE A PARTIR DE
PROTEÍNAS DE ORIGEM ANIMAL

GRACIELA SALETE CENTENARO

Prof. Dr. CARLOS PRENTICE-HERNÁNDEZ

Orientador

Profa. Dra. MYRIAM SALAS-MELLADO

Co-orientadora

RIO GRANDE, RS

2011

1 INTRODUÇÃO

A associação entre hábitos saudáveis de alimentação e o consumo de determinados alimentos, com a boa saúde da população é uma constatação antiga que somente nas últimas décadas ganhou maior impulso, direcionando as pesquisas para a busca de evidências científicas que possam explicar os mecanismos de ação de cada um dos componentes dos alimentos.

As proteínas são substâncias nitrogenadas complexas e componentes essenciais a todas as células vivas, e estão relacionadas, praticamente, a todas as funções fisiológicas. As principais fontes proteicas na alimentação humana são de origem vegetal e animal (Bobbio e Bobbio, 2003). Cientistas em várias partes do planeta têm focado sua atenção para as matérias-primas de origem vegetal e animal como fontes de compostos bioativos, os quais são reconhecidos por suas propriedades benéficas à saúde humana. O termo bioatividade se refere à componentes alimentares que podem afetar processos ou substratos biológicos e, por este motivo, podem ter um impacto sobre as funções corporais ou condições do organismo e, conseqüentemente, sobre a saúde em geral. Peptídeos biologicamente ativos vêm sendo encontrados em hidrolisados enzimáticos obtidos a partir de diversas fontes proteicas e extensivamente estudados durante os últimos 15 anos, a fim de atender os interesses de pesquisadores bem como da indústria farmacêutica e alimentícia no desenvolvimento de dietas contendo ingredientes funcionais, capazes de modular funções fisiológicas específicas (Das Neves et al., 2006; Sarmadi e Ismail, 2010).

Além das propriedades funcionais, tecnológicas e nutricionais, algumas proteínas podem apresentar atividade biológica, como por exemplo, atividade antioxidante, que pode estar associada aos peptídeos bioativos presentes em determinadas sequências da proteína, liberados após a hidrólise enzimática (Costa et al., 2007). Os peptídeos bioativos são cadeias sequenciais de aminoácidos de pequeno tamanho, contendo entre dois e quinze resíduos, inativos dentro da proteína, que podem ser liberados através de hidrólise, exercendo efeitos benéficos para o organismo (Vioque et al., 2006). Estes peptídeos podem ser úteis não só para a saúde do indivíduo, mas também como antioxidantes naturais para a conservação de alimentos. No entanto sua atividade irá depender da composição de aminoácidos e do peso molecular (Das Neves et al., 2006), além das condições de obtenção.

A hidrólise enzimática consiste em uma reação química catalisada por uma enzima (uma hidrolase) que utiliza água (H_2O) para quebrar uma molécula em duas outras moléculas. Um dos produtos da reação catalisada receberá um grupo OH^- e, o outro produto, um próton de hidrogênio que serão incorporados à suas estruturas químicas. Em

geral, o processo de hidrólise é um tratamento que propicia o rompimento da molécula protéica em unidades menores e tem se destacado na melhoria das propriedades nutricionais e funcionais das proteínas (Boza et al., 2000) e mais recentemente nas propriedades bioativas, especialmente na atividade antioxidante (Kim e Mendis, 2006; Elias et al., 2008; Sarmadi e Ismail, 2010).

A produção de odores e sabores desagradáveis, resultantes do desencadeamento do processo oxidativo, pode tornar os alimentos inadequados para o consumo. Como resultado da reação entre o oxigênio e os ácidos graxos insaturados ocorre a formação de compostos de baixo peso molecular, os quais são os principais responsáveis pelo desenvolvimento de odores indesejáveis e mudanças na coloração e no sabor de alguns produtos. Para retardar mudanças oxidativas indesejadas, têm-se usado substâncias antioxidantes no processamento de alimentos, (Suetsuna, 2000). Embora os antioxidantes sintéticos BHA (butil-hidroxi-anisol) e BHT (butil-hidroxitolueno) sejam empregados como aditivos alimentares para prevenir a deterioração dos alimentos e apresentem atividade antioxidante mais forte que os antioxidantes naturais (incluindo α -tocoferol e ácido ascórbico), existe uma preocupação com relação a sua segurança. Estudos relacionados aos efeitos sinérgicos de aminoácidos, peptídeos, proteínas e hidrolisados protéicos têm sido realizados com o objetivo de desenvolver antioxidantes naturais e seguros (Ito et al., 1986; Kim et al., 2007; Foh et al., 2010).

Grandes esforços vêm sendo realizados para aproveitar a imensa quantidade de resíduos do processamento de alimentos, especialmente de origem animal, gerados a cada ano, e transformá-los em novos produtos. Devido ao grande número de pesquisas sobre compostos bioativos, já foram identificados e aplicados em alimentos para consumo humano, muitos compostos com atividade biológica. Alguns trabalhos científicos têm demonstrado atividade antioxidativa de hidrolisados de gema de ovo (Park et al., 2001), de pele bovina (Kim et al., 2001a), de proteínas de porco (Saiga et al., 2003), de proteína de soja (Park et al., 2005), e de caseína (Kitts, 2005; Rossini et al., 2009). Muitos trabalhos já foram publicados sobre proteínas de pescado, porém poucos trabalhos sobre peptídeos de hidrolisados de frango foram publicados. As proteínas animais procedentes das matérias-primas cárneas bem como os resíduos agroindustriais podem representar uma boa fonte de peptídeos bioativos. Uma vez demonstrada sua atividade, resistência à digestão e absorção *in vivo*, esses peptídeos podem ser usados na conservação e elaboração de alimentos funcionais para a prevenção de doenças.

A captura marinha de pescado contribui com mais de 50% do total da produção mundial de pescado e mais de 70% dessa produção tem sido utilizada para processamento. Como resultado, anualmente uma quantidade considerável do total capturado é descartada como sobras do processamento, incluindo cabeças, barbatanas, pele, espinhos, vísceras,

além de carapaças de crustáceos e mariscos. Estatísticas da FAO revelam que anualmente o descarte dos resíduos das indústrias de pescado ultrapassa 20 milhões de toneladas, equivalente a 25% do total da produção mundial.

O Brasil é o terceiro maior produtor e líder mundial nas exportações de carne de frango. A produção total brasileira de carne de frango atingiu 12,3 milhões de toneladas em 2010 e a estimativa de produção para 2011 é de 12,9 milhões de toneladas, ou seja, um incremento de 4,8% sobre a produção de 2010. O frango é o segundo produto nas exportações do agronegócio e o sexto na pauta de exportações do país. Nos abatedouros de frango o descarte de material (penas, vísceras, pés, cabeça, pele e sangue) representa 30% do peso total do animal, ou seja, 3,7 milhões de toneladas de resíduos que são descartados por ano (UBABEF, 2010).

A maioria dos subprodutos das indústrias de processamento de pescado e frango é destinada à produção de fertilizantes, farinha, ração animal, óleo e silagem, mas muitos desses produtos apresentam baixo valor econômico. O trato inadequado desses subprodutos industriais contribui para o agravamento dos problemas ambientais, pois, quando não podem ser transformados, são lançados em rios e mananciais, causando poluição, cujas consequências são conhecidas. Por isso, esses subprodutos apresentam um grande potencial para as indústrias de processamento de produtos de origem animal, que podem converter e agregar valor aos mesmos.

Para o desenvolvimento dessa tese foram escolhidas duas matérias-primas para obtenção de hidrolisados protéicos: pescado e frango. A primeira devido à proposta de tese ter sido apresentada dentro do programa de pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos na linha de pesquisa “Valoração de Recursos Hidrobiológicos”, e a segunda em função do Projeto Chill-On, no qual o Laboratório de Tecnologia de Alimentos da FURG é um dos integrantes. Assim, esse trabalho propõe estudar o efeito antioxidante de peptídeos obtidos a partir de hidrolisados enzimáticos de proteína de origem animal, com ênfase em pescado e frango.

2 OBJETIVOS

2.1 *Objetivo geral*

Produzir peptídeos antioxidantes através de hidrólise enzimática de proteínas de pescado e de frango utilizando diferentes enzimas.

2.2 *Objetivos específicos*

- Produzir hidrolisados enzimáticos a partir de músculo e de ossos de castanha (*Umbrina canosa*) e de frango (*Gallus domesticus*) utilizando as enzimas Flavourzyme, α -Quimotripsina e Tripsina para a avaliação da atividade antioxidante;
- Caracterizar os hidrolisados protéicos (músculo e ossos) de pescado e de frango quanto à sua composição e atividade antioxidante;
- Fracionar os hidrolisados em frações peptídicas de diferentes pesos moleculares utilizando ultrafiltração por membranas;
- Caracterizar e comparar as frações peptídicas em relação à atividade antioxidante;
- Avaliar a atividade antioxidante dos hidrolisados em um sistema alimentício.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Pescado

O pescado é uma das principais fontes de diversos componentes com elevado valor nutricional, como as proteínas e os ácidos graxos da série ômega-3, que trazem inúmeros benefícios à saúde (Brasil, 1997). O músculo é composto principalmente de proteínas de elevado valor nutritivo e rico em aminoácidos essenciais, especialmente aqueles limitantes em proteínas de origem vegetal (Neves et al., 2004). Além de ser importante na alimentação humana, proporciona o desenvolvimento de produtos de valor para a indústria. A composição química do pescado depende de muitas variáveis, entre as quais se destacam a espécie, idade, estado fisiológico, época e região de captura. O pescado de mais idade, por exemplo, é geralmente rico em gordura e, portanto contém menor proporção de água (Ordóñez, 2005).

O Rio Grande do Sul é responsável por grande parte do potencial pesqueiro nacional, apresentando um desembarque de 31.650,639 ton em 2008, dos quais a castanha (*Umbrina canosa*) foi responsável por 29,5% (IBAMA, 2009). A castanha (Figura 1), ou “pargo branco” como é chamada no Uruguai e na Argentina, é um importante recurso pesqueiro explorado principalmente no sul do Brasil. É uma espécie semi-gorda da família *Sciaenidae* com hábito demersal. A pesca de castanha é sazonal, com a maior parte dos desembarques concentrada no segundo semestre de cada ano, época em que o estoque adulto se encontra em sua maior parte em águas brasileiras quando se deslocam, acompanhando a penetração de águas mais frias, para desovar no litoral do Rio Grande do Sul (Haimovici et al., 2006).

Segundo a FAO (2009), a proteína de origem animal mais consumida mundialmente é o pescado, no entanto o Brasil apresenta um baixo índice de consumo (9,03kg/per capita/ano), quando comparado com países europeus e americanos. Este índice, dentre outros fatores, provavelmente deve-se à falta de conhecimento da importância do pescado na alimentação. Conforme Neiva (2005) as perspectivas da demanda mundial de pescado para consumo humano direto são determinadas pelo crescimento da população, mudanças de ingresso per capita e ritmo da urbanização.



Figura 1. Castanha (*Umbrina canosa*)

3.2 Frango

Os hábitos alimentares do homem moderno vêm sofrendo alterações e acompanhando o progresso tecnológico das indústrias alimentícias, que lançam cada vez mais produtos no mercado. O Brasil é o terceiro maior produtor, e líder mundial nas exportações de carne de frango. A produção total brasileira de carne de frango atingiu cerca de 12,3 milhões de toneladas em 2010. A estimativa de produção para 2011 é de 12,9 milhões de toneladas, ou seja, um incremento de 4,8% sobre a produção de 2010. É o segundo produto nas exportações do agronegócio e o sexto na pauta de exportações do país com estimativa de geração de 3,8 milhões de empregos na cadeia produtiva (UABEF, 2010).

Em geral a composição da carne de aves depende de sua espécie, sexo, idade e dieta. A carne de aves, especialmente de frango (Figura 2) é considerada de boa qualidade nutricional pelo seu alto teor protéico, baixo colesterol e baixo teor de ácidos graxos saturados. Em geral, constitui de 18 a 20% do peso do músculo magro, enquanto que a água e a gordura representam acima de 75 e 5% respectivamente (Barbut, 2002). É um alimento de fácil digestão, sendo indicado na alimentação infantil, de pessoas idosas e convalescentes. Contribui ainda, com 21% das necessidades diárias de cálcio, nutriente essencial que atua na preservação dos ossos e dos dentes (Moraes, 1987).



Figura 2. Frango (*Gallus domesticus*)

3.3 Proteínas de origem animal

Quimicamente, as proteínas são polímeros (Figura 3) cujas unidades básicas são os aminoácidos, unidos entre si por ligações peptídicas (Figura 4) formando longas cadeias, em várias estruturas geométricas e combinações químicas para formar as proteínas específicas, cada qual com sua atividade fisiológica. As proteínas são geralmente formadas por aminoácidos padrões, sendo que a proporção dos mesmos varia conforme a característica da fonte de proteína (Sgarbieri, 1996).

entanto, um descongelamento inadequado pode levar à extração de parte das proteínas. Na indústria pode-se concentrar a fração protéica do pescado e produzir concentrados com teor protéico de 95% ou superior (Oetterer, 1996).

As mudanças que alteram a textura do pescado são resultado direto das mudanças que ocorrem nas proteínas miofibrilares. No pescado, a proporção de proteínas miofibrilares, em termos de proteína muscular, é superior à da carne dos animais de abate como o frango, mas basicamente encontram-se os mesmos tipos de proteínas e quase nas mesmas proporções relativas (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. O colágeno é a proteína mais abundante nos animais de abate, podendo atingir 30% do total das proteínas nos indivíduos adultos. 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 aminoácidos Gly-X-Y (onde X é 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, solidez e estabilidade (Guimarães et al., 1995). O colágeno tem composição em aminoácidos muito característica: 33% dos resíduos de aminoácido que formam o colágeno são de glicocola e 23% de mistura de prolina e hidroxiprolina. Outro aminoácido típico do colágeno é a hidroxilisina. O colágeno e a gelatina são proteínas únicas comparadas com as proteínas do músculo e essa diferença deve-se ao seu conteúdo de aminoácidos os quais são ricos em aminoácidos apolares (acima de 80%) como glicina, alanina, valina e prolina. Além da pele de pescado, o colágeno pode se isolado a partir de ossos espinhas e barbatanas (Ordóñez, 2005). No pescado sua quantidade é quase sempre menor do que na carne dos animais de abate, variando de 3 a 10%, sendo que quando encontrado na pele, tendões e como parte do músculo esquelético, influi muito na maciez da carne. As proteínas de pescado, ou derivadas dos subprodutos do processamento, podem ser hidrolisadas enzimaticamente para recuperar essa biomassa protéica que é descartada como resíduo (Kim e Mendis, 2006). A transformação de um material descartável em um subproduto e finalmente em um produto, requer um longo processo, baseado em tecnologia, conhecimento, necessidade, fatores econômicos e legislação.

A carne de aves se destaca por ter uma aceitação quase universal entre as diversas culturas e tradições culinárias. Deve-se considerar também que essas carnes apresentam baixo custo de produção, principalmente porque a conversão da ração em carne de frango é alta (Godoy Filho, 1997). A evolução da tendência pela preferência por carnes brancas está

vinculada a vários fatores: redução de custos na obtenção da matéria-prima, pequena oscilação de preços no varejo e oferta cada vez maior de produtos derivados como presuntos, linguiças, hambúrgueres, empanados, reestruturados, entre outros. A carne de aves além de ser rica em proteínas, é também fonte importante de energia e de outros nutrientes como vitaminas, minerais e lipídios. A carne de frango é bastante rica em ferro e vitaminas do complexo B, em especial niacina e riboflavina, e é uma das mais consumidas pela população brasileira. O papel chave dos produtos alimentícios de origem animal na dieta da maioria das civilizações reside na importância destes alimentos serem fornecedores de minerais, vitaminas e de proteína de alta qualidade. Por ser considerada uma boa fonte de carne magra, é provável que a demanda destes produtos continue em alta por muitos anos (Moreira et al., 1998).

O aumento de consumo de produtos processados de frangos gera um grande volume de componentes subutilizados da carcaça tais como, pele, coração, moela, pés além da carne mecanicamente separada, os quais são ricos em colágeno (Bonifer e Froning, 1996). Inúmeros resíduos das indústrias de carne que contêm colágeno poderiam ser utilizados para a extração desta proteína. Com exceção da sua utilização como gelatina, o mesmo não é muito aproveitado tecnologicamente (Barbut, 2002). Grandes quantidades de resíduos animais podem ser aproveitadas, principalmente em países onde parte da população é subnutrida. A recuperação e transformação dos resíduos das indústrias de alimentos assumem grande importância, pois permitem não só diminuir o custo com insumos principais, minimizar os problemas de poluição ambiental, como também criar novas fontes alternativas de alimentos de alto valor nutricional com características sensoriais adequadas e preço acessível, além de serem um potencial para a descoberta de novos compostos e estruturas (Rosa, 2000).

3.4 Processos Enzimáticos

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 totalmente inespecíficas e destruiriam aminoácidos como o triptofano, o que compromete o seu valor nutricional. Essas modificações podem ocorrer *in vitro* ou *in vivo* (Sgarbieri, 1996).

A hidrólise de proteínas alimentares é realizada por várias razões, incluindo características de melhoramento nutricional, retardamento da deterioração, aumento ou diminuição da solubilidade, aumento de propriedades espumantes ou coagulantes, aumento da capacidade emulsificante, prevenção de interações indesejáveis, remoção de sabores,

odores, inibidores e ingredientes tóxicos, entre outros. A hidrólise com enzimas é mais indicada para a produção de hidrolisados com aplicações nutricionais, que os métodos químicos. O uso de enzimas na manipulação de proteínas garante maior especificidade, controle e segurança dos hidrolisados, obtidos do que a utilização de meios químicos. A hidrólise enzimática de proteínas produz peptídeos com pesos moleculares variáveis e alterações na estrutura nativa da proteína, assim como previne reações indesejáveis devido a sua especificidade de ação, utiliza condições moderadas de tratamento e menor energia no processo, sendo possível sua inativação após o uso (Kristinsson e Rasco, 2000b).

Também é possível produzir hidrolisados com perfil peptídico bem definido, enquanto que as hidrólises ácida e alcalina podem destruir L-aminoácidos, produzindo D-aminoácidos e ainda formar substâncias tóxicas. Isso é especialmente crítico em hidrolisados protéicos, onde a proporção de aminoácidos, dipeptídeos e tripeptídeos é importante para a absorção pelo organismo (Lahl e Braun, 1994). Geralmente, a hidrólise enzimática das proteínas musculares é caracterizada por uma rápida fase inicial, durante a qual, várias ligações peptídicas são hidrolisadas. A seguir, esta taxa de hidrólise enzimática decresce e atinge uma fase estacionária, na qual nenhuma hidrólise aparente ocorre (Kristinsson e Rasco, 2000a).

Várias enzimas hidrolíticas de origem microbiana, vegetal e animal são empregadas na hidrólise de subprodutos do processamento de alimentos. Os peptídeos presentes nos hidrolisados protéicos digeridos enzimaticamente têm mostrado diferentes propriedades físico-químicas e atividades biológicas que dependem de sua sequência de aminoácidos e de seu peso molecular. Sabe-se que o peso molecular dos fragmentos de peptídeos é o fator chave para sua atividade biológica e para o desenvolvimento de métodos de separação desses peptídeos (Li et al., 2008; Sarmadi e Ismail, 2010).

A hidrólise enzimática de proteínas é importante para o preparo de produtos com propriedades funcionais únicas e características benéficas relacionadas à saúde sendo a ferramenta mais importante para identificar diferentes compostos bioativos (Shahidi e Kamil, 2001). Ela tem sido empregada para converter biomassa subutilizada, a qual é geralmente destinada à produção de ração animal ou fertilizantes, em produtos protéicos.

Os hidrolisados podem ser classificados de acordo com o grau de hidrólise e com a sua aplicação, agrupando-se em três classes: a) hidrolisados com baixo grau de hidrólise, para melhoria das propriedades funcionais; b) hidrolisados com grau de hidrólise variável, para a utilização como aromatizantes; c) altamente hidrolisados, usados em alimentos para fins especiais (Vioque, et al., 2001). O grau de hidrólise (GH) é definido como o número de ligações peptídicas hidrolisadas em relação ao número total de ligações peptídicas de uma determinada proteína. Proteínas intactas têm valor de $GH = 0\%$ e uma proteína completamente hidrolisada tem valor de $GH = 100\%$. O GH é determinado pelas condições

do processo (relação enzima:substrato, tempo, temperatura e pH) e influenciado pela natureza da atividade enzimática (Panyam e Kilara, 1996).

Os hidrolisados também têm sido utilizados como suplementos protéicos na elaboração de dietas para a alimentação enteral de bebês e adultos enfermos, fórmulas hipoalergênicas para lactentes e lactantes, suplementos para praticantes de atividade física, dietas para idosos e controle de peso (Cândido e Sgarbieri, 2003).

Kristinsson e Rasco (2000a) informaram que a hidrólise protéica, com enzimas proteolíticas selecionadas, possibilita controlar o grau de quebra da proteína, indicando que a utilização de proporções enzima/substrato e tempos de reação adequados, permitem a produção de hidrolisados com diferentes estruturas moleculares, funcionalidade e bioatividade, encontrando aplicações na indústria farmacêutica, de alimentos e de cosméticos.

Logo, a aplicação de tecnologia enzimática é um método alternativo para um melhor aproveitamento de espécies de pescado sem valor comercial e matérias-primas cárneas com grande disponibilidade como o frango e seus resíduos do processamento. Esta prática eleva o valor protéico dos produtos tornando-os mais aceitáveis para o consumo humano na forma de uma nova fonte alimentar, ou para a elaboração de compostos bioativos com funções específicas (Diniz e Martin, 1996; Kim e Mendis, 2006).

Na ciência e tecnologia de alimentos, as enzimas são exploradas para realizar determinadas funções em processos e análises facilitando a conversão de matérias-primas em alimentos de alta qualidade. Estas tornam isso possível porque seu sítio ativo é altamente específico para certos substratos, pois agem formando um complexo com o substrato catalisando sua transformação (Kristinsson e Rasco, 2000a).

As enzimas são catalisadores bioquímicos essenciais para a sobrevivência, pois aceleram reações químicas entre os constituintes orgânicos das células. Existe uma grande variedade de enzimas disponíveis comercialmente que diferem em relação à fonte biológica, atividade, pureza, forma física e características tais como pH e temperatura ótima, além de seu preço. As enzimas utilizadas pela indústria de alimentos e em pesquisas são predominantemente as hidrolases, a maioria carboidrases, seguido das proteases e lipases. As enzimas proteolíticas, proteases ou proteinases pertencem ao grupo das hidrolases as quais têm em comum o envolvimento da água na formação do produto. As proteases catalisam a reação de hidrólise das ligações peptídicas das proteínas, ocasionando a transferência de componentes do substrato para a água. Estas enzimas podem ser de origem animal, vegetal ou microbiana (Whitaker, 1994).

As proteases estão entre as enzimas mais estudadas e os preparados de enzimas proteolíticas são economicamente o grupo mais importante, e seu uso está bem estabelecido na indústria de alimentos. São caracterizadas de acordo com a especificidade

de ligações peptídicas atacadas e seu mecanismo de ação. As enzimas utilizadas na hidrólise da proteína de pescado possuem pelo menos uma característica em comum que é fazerem parte da categoria de alimentos e, se forem de origem microbiana, o organismo produtor deve ser não-patogênico. A escolha da enzima é normalmente determinada pela combinação entre eficácia e economia (Kristinsson e Rasco, 2000a). Usando proporções enzima-substrato e tempos de reação adequados é possível produzir hidrolisados com diferentes estruturas moleculares, diferentes propriedades funcionais e bioativas que podem encontrar aplicações em vários produtos alimentícios (Onodenalore e Shahidi, 1996; Sakanaka et al, 2005).

Quatro principais classes de proteases são conhecidas, sendo denominadas pelo grupo funcional principal no seu sítio ativo: serina, tiol, carboxil e metalo. As proteases são caracterizadas em endoproteínases e exopeptidases. As endoproteínases hidrolisam as ligações peptídicas nas moléculas de proteínas, geralmente em resíduos específicos a fim de produzir peptídeos relativamente grandes. As exopeptidases removem sistematicamente aminoácidos do nitrogênio terminal, chamadas aminopeptidases ou do carbono terminal, chamadas carboxipeptidases. Para hidrolisar proteínas alimentares, geralmente são usadas endoproteínases, ocasionalmente combinadas com exopeptidases a fim de realizar uma degradação completa (Kristinsson e Rasco, 2000a). No processo de hidrólise, as enzimas proteolíticas são utilizadas para solubilizar a proteína muscular, resultando em duas fases distintas, a solúvel e a insolúvel. A fração insolúvel é utilizada como ração animal, enquanto que a solúvel pode ser convertida em ingredientes e incorporada em alimentos. O hidrolisado solúvel pode ser submetido à desidratação resultando em uma forma mais estável, em pó, com alta concentração protéica (Diniz e Martin, 1996). A Figura 5 representa um processo típico de obtenção de hidrolisado protéico sugerido por Kristinsson e Rasco (2000a).

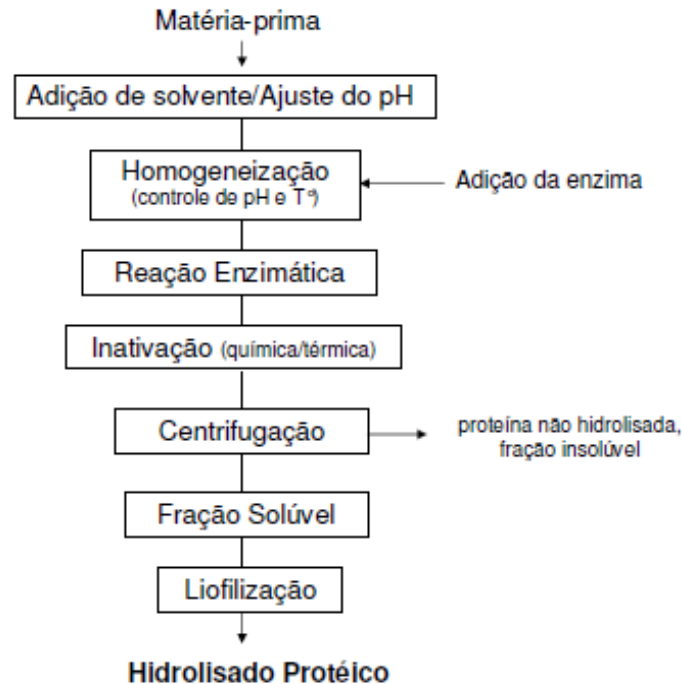


Figura 5. Fluxograma do processo de obtenção de hidrolisado protéico. (Fonte: Kristinsson e Rasco, 2000a)

3.4.1 Flavourzyme

Flavourzyme (EC 3.4.11.1) também conhecida como leucil aminopeptidase, contém atividade de ambas exo e endopeptidase, e é produzida por fermentação submersa do fungo *Aspergillus oryzae*, desenvolvida pela Novozyme Nordisk (Bagsvaerd, Dinamarca). Apresenta ótima atividade em pH na faixa de 5-7 e temperatura em torno de 45-50 °C. 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 et al., 2008). A Flavourzyme tem sido amplamente utilizada para produção de hidrolisados protéicos (Rossini et al, 2009; Martins et al., 2009; Hou et al., 2011).

3.4.2 α - Quimotripsina

Serino endopeptidase (EC 3.4.21.1), a enzima α -Quimotripsina é obtida a partir do quimotripsinogênio do pâncreas bovino e suíno e atua na hidrólise preferencialmente de ligações peptídicas nos grupos carboxila da fenilalanina, tirosina, triptofano e leucina.

Também atua na clivagem de ligações peptídicas nos grupos carboxila da metionina, asparagina e glutamina. As condições ótimas de atuação são pH variando de 7 a 9 e temperatura em torno de 40 °C (IUBMB, 2011).

3.4.3 Tripsina

A Tripsina, serino endopeptidase (EC 3.4.21.4), é uma enzima mais seletiva em relação a outras enzimas, catalisa preferencialmente a hidrólise de ligações peptídicas onde o grupo carboxila faz parte do resíduo da lisina ou da arginina. Assim como a α -Quimotripsina, suas condições ótimas de atividade são, pH variando de 7 a 9 e temperatura em torno de 40 °C (IUBMB, 2011).

3.5 Alimentos de natureza protéica com atividade biológica

Está cada vez mais acentuada a procura por alimentos, que de um modo específico, ofereçam benefícios à saúde dos consumidores. Por isso, tem crescido o interesse por parte das indústrias em incorporar às dietas ingredientes que contenham substâncias capazes de oferecer benefícios à saúde. Em princípio, todos os alimentos desempenham o papel funcional de nutrir o organismo, fornecer energia e contribuir para a prevenção de doenças, pois fornecem elementos para o crescimento, desenvolvimento e manutenção das atividades vitais (Bello, 1995). Geralmente a produção de insumos e alimentos industrializados para consumo humano gera boa rentabilidade, mas atualmente a expectativa de valorização de certos produtos a partir da produção de compostos bioativos desperta interesse tanto dos setores industriais como de instituições de pesquisa. Esses compostos podem ser extraídos e purificados com tecnologias que variam das mais simples as mais complexas, pois tais compostos podem envolver a preparação e o isolamento de peptídeos bioativos, oligossacarídeos, ácidos graxos, enzimas, minerais e biopolímeros, para aplicações biotecnológicas e farmacêuticas (Kim e Mendis, 2006).

Há consideráveis evidências de que proteínas intactas e peptídeos podem entrar na circulação em quantidades fisiologicamente importantes, como demonstrado por Chabance et al. (1998), que detectaram dois fragmentos da α_{S1} -caseína (resíduos 1-23 e 1-21) no plasma humano, 20 min e 1 h após a ingestão de leite fermentado. Os peptídeos funcionais são absorvidos principalmente pela via paracelular, ou seja, qualquer substância solúvel em água que não tenha um transportador específico pode ser absorvida por difusão passiva entre os enterócitos (Shimizu, 1999). Em seguida, entram para a circulação sanguínea via sistema porta-hepático, atingindo os órgãos específicos, onde exercem suas atividades.

Dentre as propriedades fisiológico-funcionais que os peptídeos podem desempenhar destacam-se:

- atividade opióide;
- ação estimulante do sistema imunológico;
- aumento da biodisponibilidade de minerais, particularmente do cálcio;
- atividade antiúlcera, anti-hipertensiva e anticarcinogênica;
- atividade anti-tumoral e antimicrobiana;
- capacidade de complexação aos ácidos biliares e
- atividade antioxidante.

Os chamados peptídeos opióides são aqueles derivados da hidrólise enzimática de proteínas alimentares que apresentam afinidade por receptores opióides. Assim como os opióides endógenos, caracterizam-se por similaridades na sequência primária, como por exemplo, a presença de tirosina na porção N-terminal. Alguns destes peptídeos, quando injetados na corrente sanguínea, induzem um efeito analgésico. Devido à ação no sistema nervoso, estes podem estimular a atividade do pâncreas endócrino e reduzir o tempo de trânsito gastrointestinal, neste caso afetando diretamente o aumento da absorção de aminoácidos (Costa, 2004).

O sistema imunológico pode ser modulado pelas imunoglobulinas presentes no soro do leite através da transmissão da imunidade passiva. A partir dessa observação, a indústria de alimentos tem desenvolvido produtos como o *Inmune milk*TM enriquecido com imunoglobulinas produzidas por vacas imunizadas contra diversos patógenos da microbiota intestinal humana (Richards, 2002). A atividade estimulante do sistema imunológico também pode ser manifestada por peptídeos derivados da hidrólise de outras proteínas do leite, como a κ -caseína e α -lactoalbumina. Os caseinofosfopeptídeos originados da hidrólise das caseínas inibem a cristalização e precipitação do cálcio e fosfato e são resistentes à hidrólise pelas enzimas pancreáticas. Dessa forma, eles apresentam uma grande importância na disponibilidade do cálcio, embora também possam atuar como carreadores de outros elementos, como zinco, ferro e cobre (Meisel, 1998).

De acordo com Kahlon e Woodruff (2002) acredita-se que a menor incidência das doenças coronárias nos países asiáticos seja devido ao elevado consumo de soja e derivados. O mecanismo de ação proposto inclui a redução da absorção do colesterol ou ácidos biliares e alteração no metabolismo hepático de colesterol e lipoproteínas por meio da complexação com proteínas da soja, durante a digestão. Esses autores também observaram o mesmo potencial hipocolesterolêmico na proteína do feijão preto.

O desenvolvimento de alimentos funcionais significa uma maneira eficaz de incrementar os benefícios terapêuticos de muitos alimentos convencionais, além de manter seu nível de aceitação como produto natural. Esta revolução começou na década de 80,

quando estudos clínicos divulgaram os efeitos deletérios à saúde relacionados ao consumo excessivo de alimentos refinados, ricos em gorduras saturadas e sódio, e pobres em fibras (Bello, 1995). Conforme De Felice (1995) neste mesmo período houve a divulgação dos benefícios das fibras na prevenção do câncer do cólon, o que deu suporte à introdução, pela indústria americana, dos alimentos enriquecidos com fibra dietética, gorduras insaturadas de estrutura ômega e β -caroteno, como substância de atividade antioxidante.

Diversos pesquisadores têm relatado que alguns peptídeos derivados de ostras mostraram atividade antihipertensiva inibindo a ação da enzima conversora de angiotensina I (ACE) tão intensa quanto outros peptídeos naturais. Esses peptídeos exibiram atividade de diminuição da pressão sanguínea em ratos espontaneamente hipertensivos (Je et al., 2005b).

A capacidade das proteínas de soro de melhorar as defesas antioxidantes do organismo e reduzir a carga de oxidantes está surgindo como uma das mais promissoras contribuições para a saúde em geral. De acordo com Walzem (2007) os peptídeos derivados da proteína de soro, administrados por meio da alimentação, tiveram bom desempenho como inibidores de tensão oxidante em ratos, mesmo com baixos níveis de vitamina E alimentar.

3.6 Histórico sobre o uso de antioxidantes

O retardamento das reações oxidativas por certos compostos foi primeiramente registrado por Berthollet, em 1797, e depois esclarecido por Davy, em 1817. O curso da rancificação de gorduras permaneceu desconhecido até Duclaux demonstrar que o oxigênio atmosférico era o maior agente causador de oxidação dos ácidos graxos livres. Vários anos mais tarde, Tsujimoto descobriu que a oxidação de triglicerídeos altamente insaturados poderia provocar odor de ranço em óleo de pescado. Wright, em 1852, observou que índios americanos do Vale de Ohio preservavam gordura de urso usando casca de omeiro (Ramalho e Jorge, 2006).

O uso de antioxidantes na indústria de alimentos e seus mecanismos funcionais têm sido amplamente estudado. O conhecimento atual das propriedades de vários produtos químicos para prevenir a oxidação de gorduras e alimentos gordurosos começou com estudos clássicos de Moureu e Dufraise. Durante a 1ª Guerra Mundial e pouco depois, estes pesquisadores testaram a atividade antioxidante de mais de 500 compostos. Esta pesquisa básica, combinada com a vasta importância da oxidação em praticamente todas as operações de produção, desencadeou uma busca por aditivos químicos para controlar a oxidação, que ainda hoje está em curso (Bailey, 1996; Ramalho e Jorge, 2006).

Das centenas de compostos que têm sido sugeridos para inibir a deterioração das

substâncias oxidáveis, somente alguns podem ser usados em produtos para consumo humano. Na seleção de antioxidantes, são desejáveis as seguintes propriedades: eficácia em baixas concentrações (0,001 a 0,01%); ausência de efeitos indesejáveis na cor, no odor, no sabor e em outras características do alimento; compatibilidade com o alimento e fácil aplicação; estabilidade nas condições de processo e armazenamento sendo que o composto e seus produtos de oxidação não podem ser tóxicos, mesmo em doses muito maiores das que normalmente seriam ingeridas no alimento (Bailey, 1996). A medida da oxidação lipídica do radical livre, o estresse oxidativo e os antioxidantes são amplamente discutidos em muitas áreas de pesquisa. A geração descontrolada de radicais livres que atacam a membrana lipídica, proteínas e DNA é conhecida por estar envolvida em muitas doenças como diabetes mellitus, câncer, doenças inflamatórias, neurodegenerativas entre outras (Butterfield et al., 2002). Além disso, na escolha de um antioxidante deve-se considerar também outros fatores, incluindo legislação, custo e preferência do consumidor por antioxidantes naturais (Rafecas et al., 1998).

3.7 Antioxidantes mais utilizados em alimentos

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, 1999). Segundo o FDA (Food and Drug Administration), são substâncias utilizadas para preservar e estender a vida-útil dos alimentos que possuem lipídios oxidáveis, retardando as reações de oxidação (Pokorny, 1991). Estes compostos inibem não só a peroxidação lipídica, mas também a oxidação de outras moléculas como, proteínas, DNA, entre outras.

Os antioxidantes mais abundantes são compostos aromáticos que contém pelo menos uma hidroxila podendo ser sintéticos como o butilhidroxianisol (BHA) e o butilhidroxitolueno (BHT), largamente utilizados pela indústria alimentícia, ou naturais, como substâncias bioativas (organosulfurados, fenólicos, terpenos, carotenóides e ácido ascórbico) que fazem parte da constituição de diversos alimentos (Velioglu et al., 1998; Melo e Guerra, 2002).

3.7.1 Antioxidantes sintéticos

Os antioxidantes sintéticos mais utilizados na indústria de alimentos são butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), propilgalato (PG) e tercbutilhidroquinona

(TBHQ). A estrutura fenólica destes compostos (Figura 6) permite a doação de um próton a um radical livre, regenerando, assim, a molécula do acilglicerol e interrompendo o mecanismo de oxidação por radicais livres. Dessa maneira, os derivados fenólicos transformam-se em radicais livres. Entretanto, estes radicais podem se estabilizar sem promover ou propagar reações de oxidação (Ramalho e Jorge, 2006).

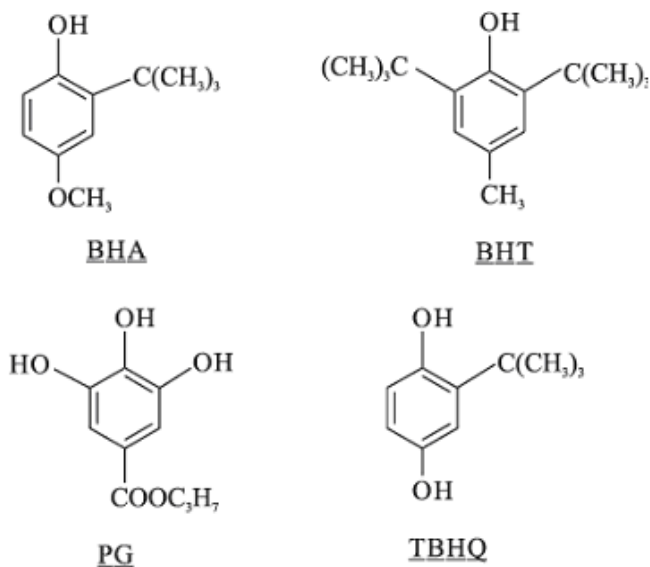


Figura 6. Estrutura fenólica dos antioxidantes sintéticos (Fonte: Ramalho e Jorge, 2006)

Estudos toxicológicos têm demonstrado que estes antioxidantes apresentaram efeito carcinogênico em experimentos com animais. Em outros estudos, o BHA mostrou induzir hiperplasia gastrointestinal em roedores por um mecanismo desconhecido. Em humanos, a relevância dessa observação não está clara, mas a redução do nível de hemoglobina e a hiperplasia de células basais foram atribuídas ao uso de TBHQ (Botterweck et al., 2000). Em função disso, existem várias regulamentações em diferentes países para o controle da quantidade destes compostos em alimentos. No Brasil, o uso destes antioxidantes é controlado pelo Ministério da Saúde que limita 200 mg/kg para BHA e TBHQ e 100 mg/g para BHT como concentrações máximas permitidas (Brasil, 1998).

3.7.2 Antioxidantes naturais

Nos últimos anos, têm-se dado ênfase às pesquisas em busca de substâncias com atividade antioxidante, provenientes de fontes naturais, que possam atuar sozinhas ou sinergicamente com outros aditivos prevenindo a deterioração oxidativa de alimentos, limitando assim, o uso de antioxidantes sintéticos (Melo e Guerra, 2002; Kim et al., 2007). Compostos típicos que possuem atividade antioxidante incluem a classe de fenóis, ácidos

fenólicos e seus derivados, flavonóides, tocoferóis, fosfolipídios, aminoácidos, ácido fítico, ácido ascórbico, pigmentos e esteróis (Roesler et al., 2007). Entre os antioxidantes naturais mais utilizados podem ser citados tocoferóis, ácidos fenólicos e extratos de plantas como alecrim e sálvia. O tocoferol, por ser um dos melhores antioxidantes naturais é amplamente aplicado como meio para inibir a oxidação dos óleos e gorduras comestíveis, prevenindo a oxidação dos ácidos graxos insaturados. A legislação brasileira permite a adição de 300 mg/kg de tocoferóis em óleos e gorduras, como aditivos intencionais, com função de antioxidante (ABIA, 1999). Os tocoferóis (Figura 7) estão presentes de forma natural na maioria dos óleos vegetais, em alguns tipos de pescado e atualmente são fabricados por síntese. A atividade antioxidante dos tocoferóis é principalmente devida à capacidade de doar seus hidrogênios fenólicos aos radicais livres lipídicos interrompendo a propagação em cadeia (Ramalho e Jorge, 2006). Os ácidos fenólicos caracterizam-se pela presença de um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula, que conferem propriedades antioxidantes. Os antioxidantes fenólicos funcionam como sequestradores de radicais e, algumas vezes, como quelantes de metais, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os produtos intermediários formados pela ação destes antioxidantes são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático apresentada por estas substâncias (Shahidi et al., 1992).

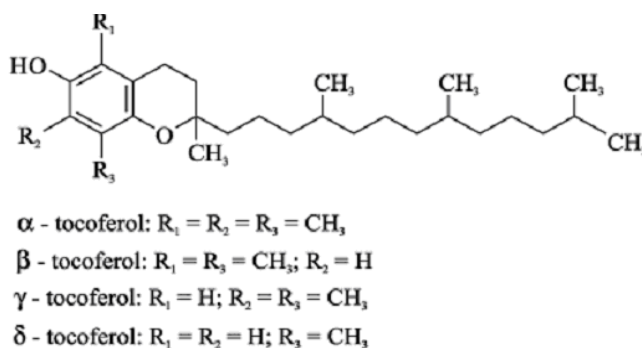


Figura 7. Molécula dos tocoferóis (Fonte: Ramalho e Jorge, 2006)

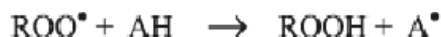
A adição de α -tocoferol como antioxidante em carnes e produtos cárneos tem sido descrito por vários pesquisadores. O α -tocoferol também tem sido utilizado em suplementação de dietas de animais onde foi investigado o seu efeito antioxidante contra peroxidação lipídica de carnes e produtos derivados. A cor das carnes é um dos atributos de qualidade considerado muito importante. Em carnes frescas, o pigmento responsável pela cor é a mioglobina (pigmento heme) que pode estar sob três formas, dependendo principalmente do estado de oxidação do ferro do grupo heme (Barreto et al., 1999). A mioglobina reduzida apresenta coloração vermelha púrpura, a metamioglobina (mioglobina

oxidada), coloração marrom e a oximioglobina (mioglobina oxigenada), coloração vermelha brilhante. Várias investigações têm demonstrado que o α -tocoferol suplementado em dietas de animais ou adicionado diretamente nos produtos melhora a estabilidade da cor de carnes e seus produtos (Barreto et al., 1999).

Juntamente com diversos antioxidantes naturais conhecidos, como vitamina C, polifenóis, flavonóides e carotenóides, peptídeos com propriedades antioxidantes também são o foco de recentes pesquisas (Sarmadi e Ismail, 2010).

3.8 Classificação e Mecanismo de Ação dos Antioxidantes

De acordo com seu modo de ação, os antioxidantes podem ser classificados em primários, sinérgicos, removedores de oxigênio, biológicos, agentes quelantes e antioxidantes mistos (Sánchez-Moreno, 2002). Dentre eles os antioxidantes mistos incluem compostos de plantas e animais que têm sido amplamente estudados como antioxidantes naturais em alimentos, incluindo várias proteínas hidrolisadas, flavonóides e derivados de ácido cinâmico (ácido caféico). A Figura 8 representa o mecanismo de ação dos antioxidantes.



onde: ROO^{\bullet} e R^{\bullet} - radicais livres; AH - antioxidante com um átomo de hidrogênio ativo e A^{\bullet} - radical inerte

Figura 8. Mecanismo de ação dos antioxidantes primários (Fonte: Ramalho e Jorge, 2006)

O átomo de hidrogênio ativo do antioxidante é abstraído pelos radicais livres R^{\bullet} e ROO^{\bullet} com maior facilidade que os hidrogênios alílicos das moléculas insaturadas. Assim formam-se espécies inativas para a reação em cadeia e um radical inerte (A^{\bullet}) procedente do antioxidante. Este radical, estabilizado por ressonância, não tem a capacidade de iniciar ou propagar as reações oxidativas (Ramalho e Jorge, 2006).

3.9 Atividade antioxidante dos peptídeos

A oxidação é um processo metabólico que leva à produção de energia necessária para as atividades essenciais das células. Entretanto, o metabolismo do oxigênio nas células vivas também leva à produção de radicais. Oxidantes são compostos produzidos pelo metabolismo normal do corpo e, se não controlados, podem provocar grandes danos.

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 balanço 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). O potencial antioxidante de um composto é determinado pela reatividade do mesmo como doador de elétrons ou hidrogênio, capacidade de deslocar ou estabilizar um elétron desemparelhado, reatividade com outro antioxidante e reatividade com oxigênio molecular (Oliveira, 2005).

Peptídeos antioxidantes obtidos a partir de hidrolisados enzimáticos de esqueleto de linguado de cauda amarela foram produzidos por Jun et al. (2004), através de hidrólise com pepsina e enzima do intestino de cavala e após, purificados e caracterizados. Os autores determinaram a sequência de aminoácidos do peptídeo antioxidante isolado e verificaram que o mesmo era composto de 10 resíduos de aminoácidos, Arg-Pro-Asp-Phe-Asp-Leu-Glu-Pro-Pro-Tyr, o qual continha resíduos de tirosina, que é um potente doador de hidrogênio.

No estudo de Je et al. (2005c) a proteína do esqueleto de polaca do Alaska (*Theragra chalcogramma*) foi hidrolisada com enzimas endógenas de cavala. Os hidrolisados foram fracionados de acordo com o peso molecular, usando um sistema de ultrafiltração por membranas, obtendo-se cinco frações com diferentes pesos moleculares. Em seguida os autores determinaram a atividade antioxidante dos hidrolisados e compararam com o antioxidante natural α -tocoferol. A fração que apresentou a maior atividade antioxidante foi purificada e a sequência do peptídeo foi verificada como sendo Leu-Pro-His-Ser-Gly-Tyr com um peso molecular de 672 Da.

No trabalho de Mendis et al. (2005b) foi proposta uma investigação *in vitro* do efeito antioxidante de peptídeos obtidos a partir da hidrólise de gelatina de pele de lula gigante, empregando três enzimas: tripsina, α -quimotripsina e pepsina. Os autores relataram que o grau de hidrólise, assim como a atividade antioxidante auxiliaram na inibição da peroxidação lipídica medida em sistema modelo com ácido linoléico. Os hidrolisados foram fracionados usando a técnica de ultrafiltração por membranas e como esperado, a maior atividade antioxidante foi observada na fração peptídica com menor peso molecular (<3000 Da). Segundo os pesquisadores, a hidrólise favoreceu a atividade antioxidante dos hidrolisados, pois os mesmos são constituídos de pequenos peptídeos com elevado grau de hidrólise.

Os hidrolisados de gelatina de lula, obtidos por Mendis et al. (2005b), se apresentaram ricos em aminoácidos hidrofóbicos (>51%) e a abundância desses aminoácidos era esperada por exercerem alta afinidade com ácido linoléico. Dois peptídeos (P1 e P2) com os maiores potenciais antioxidantes foram purificados e caracterizados como sendo Phe-Asp-Ser-Gly-Pro-Ala-Gly-Val-Leu (880,18 Da) e Asn-Gly-Pro-Leu-Gln-Ala-Gly-

Pro-Gly-Glu-Arg (1241,59 Da). Os autores relatam que especificamente, resíduos de fenilalanina e leucina no N-terminal e C-terminal podem contribuir para a atividade e que a atividade antioxidante dos peptídeos de gelatina de pele de lula deve-se à hidrofilicidade-hidrofobicidade na sequência e também ao baixo peso molecular de P1 podendo desempenhar uma maior atividade antioxidante em relação a P2.

Suetsuna (2000) estudou a atividade antioxidante de peptídeos obtidos a partir de músculo de camarão hidrolisado por várias proteases e verificou que leucina pode favorecer a atividade antioxidante quando presente no C-terminal. Segundo o autor, o hidrolisado digerido com pepsina por 20 h, em pH 2,0, a 37 °C, apresentou a maior atividade antioxidante. Três peptídeos foram isolados e suas estruturas foram identificadas como sendo Ile-Lys-Lys, Phe-Lys-Lys, Phe-Ile-Lys-Lys. O autor concluiu que em relação ao aminoácido amino-terminal dos peptídeos antioxidantes, a isoleucina, um aminoácido alifático, foi mais significativa como antioxidante que a fenilalanina. Provavelmente os aminoácidos com resíduos hidrofóbicos aumentam a interação entre os peptídeos e os ácidos graxos.

Relatos dizem ainda que a agregação de proteínas através de qualquer ligação secundária ou covalente, também tem sido resultado da oxidação e diminuição na disponibilidade do α -amino-grupo da lisina e perdas de aminoácidos como histidina, tirosina, metionina, lisina e cisteína resultam da oxidação de sistemas proteína-lipídio. Alguns peptídeos que contém aminoácidos de cadeia ramificada (valina, leucina e isoleucina), mostraram significativa atividade antioxidante. Dipeptídeos contendo tirosina e triptofano no aminoácido (N-terminal), e histidina e metionina no (C-terminal), apresentaram maior atividade antioxidante que uma mistura de componente de aminoácido em sistemas aquosos (Suetsuna, 2000).

A atividade antioxidante de carnosina e histidina tem sido relatada e atribuída a habilidade para doar hidrogênio capturando o radical peroxi-lipídico, ou a habilidade quelante e sequestrante do radical lipídico pelo anel imidazol (Suetsuna, 2000 e Je et al., 2005c). Park et al. (2001), estudaram a atividade antioxidante de peptídeos de gema de ovo contendo histidina. Estes atribuíram essa atividade à habilidade quelante e de captura do radical lipídico pelo anel imidazol. Além disso, o peptídeo identificado pelos autores apresentou um resíduo de tirosina, assim como no estudo de Jun et al. (2004), a qual é um potente doador de hidrogênio na sequência.

No trabalho de Tsuge et al. (1991) foi isolado um potente peptídeo antioxidante, Ala-His-Lys, a partir de hidrolisado de albumina de ovo, onde His-Lys e uma mistura dos aminoácidos não tiveram qualquer atividade, mas Ala-His se mostrou tão potente quanto o peptídeo original.

A atividade antioxidante de peptídeos obtidos a partir de gelatina hidrolisada de pele

de polaca do Alaska foi descrita por alguns pesquisadores, e comparada com antioxidantes comerciais BHT e α -tocoferol. Os extratos de gelatina foram hidrolisados e fracionados consecutivamente em três etapas, inicialmente com Alcalase, seguido de Pronase E, e colagenase. Os resultados mostraram que a atividade oxidativa do ácido linoléico foi inibida pela adição dos hidrolisados de gelatina. Após purificação das frações, foram isolados dois peptídeos (P1 e P2) a partir da fração que apresentou maior atividade antioxidante, sendo sua seqüência de aminoácidos identificada. Os autores verificaram que os peptídeos eram compostos respectivamente de 16 e 13 resíduos de aminoácidos na seqüência Gly-Glu-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly para o peptídeo P1. O peptídeo P2 apresentou a mesma seqüência Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly, exceto para três resíduos adicionais de aminoácidos (Gly-Glu-Hyp) no N-terminal do peptídeo P1. A atividade antioxidante dos peptídeos isolados, P1 e P2, foi determinada e verificou-se que P2 mostrou atividade antioxidante maior que P1, comprovando que a mesma depende da seqüência de aminoácidos (Kim et al., 2001b).

No estudo apresentado por Saiga et al. (2003), após hidrólise de proteína miofibrilar do músculo suíno com papaína e Actinase E, verificou-se a presença de peptídeos antioxidantes. Embora o maior constituinte de aminoácidos de ambos hidrolisados foi Glx, Asx e Lys, a composição de aminoácidos dos hidrolisados obtidos com papaína foi diferente dos obtidos a partir de Actinase E, e o conteúdo de aminoácidos hidrofóbicos dos hidrolisados de papaína foi maior que nos hidrolisados obtidos com Actinase E.

Mendis et al. (2005a) estudaram as propriedades antioxidantes de um peptídeo com potencial radical sequestrador, obtido de hidrolisados de gelatina de pele de hoki (*Johnius belengerii*), preparado enzimaticamente. O peptídeo foi purificado e separado a partir da fração mais ativa e nomeado pelos autores de peptídeo derivado de gelatina com radical sequestrante (GRSP). Estes observaram que na seqüência do GRSP mais de 50% dos resíduos eram compostos de aminoácidos hidrofóbicos e leucina. Segundo os autores o elevado potencial antioxidante desse peptídeo era esperado devido a ampla hidrofobicidade, a qual pode levar a uma maior interação entre os peptídeos e os ácidos graxos. Além disso, a hidrofobicidade e a posição específica dos resíduos de aminoácidos na seqüência da cadeia peptídica representam um papel importante na atividade antioxidante.

Estudos realizados com extrato de carne de aves atribuíram a atividade antioxidante do mesmo a dois peptídeos, anserina (β -alanil-L-1-metil histidina) e carnosina (β -alanil-metil histidina) derivados do músculo esquelético animal, sendo estes capazes de inibir a oxidação lipídica catalisada por ferro heme e não-heme. O estudo utilizou uma técnica de desmineralização e a enzima papaína, a fim de reduzir os níveis de prooxidantes, mantendo elevado os níveis de anserina e carnosina em extratos de carne de aves (frango, peru e pato). Os extratos desmineralizados apresentaram maior quantidade de anserina, carnosina

e ferro heme e não-heme, que os extratos não desmineralizados. Os autores observaram que a capacidade de doar hidrogênio dos extratos de carne de frango, desmineralizados e não desmineralizados, não apresentou diferença significativa, no entanto, os extratos de carne de frango desmineralizados mostraram maior habilidade quelante do ferro que os não desmineralizados (Huang e Kuo, 2000).

Todas estas evidências têm levado pesquisadores a sugerir o uso de peptídeos como ingredientes funcionais na preservação de alimentos e de doenças relacionadas à dieta, porém somente nos últimos anos vêm aumentando os estudos para determinar a atividade antioxidante desses peptídeos derivados de hidrolisados de proteína animal. Segundo Meisel (1998), é importante obter dados suficientes, baseados em estudos com modelo humano, animal e celular, para que a avaliação clínica das substâncias bioativas derivadas dos alimentos não seja super estimada. Além disso, pesquisar as alterações em longo prazo e a ocorrência de efeitos adversos é fundamental para avaliar a atividade antioxidante dos peptídeos.

3.10 Métodos para determinação da atividade antioxidante

Existem diversos métodos para avaliar a atividade antioxidante *in vitro* de substâncias biologicamente ativas, envolvendo desde ensaios químicos com substratos lipídicos a ensaios mais complexos utilizando as mais diversas técnicas instrumentais. Embora existam poucos estudos *in vivo* realizados até à data, estudos *in vitro*, usando diferentes ensaios químicos têm indicado o potencial de peptídeos derivados de alimentos como agentes antioxidantes para controlar vários processos oxidativos em alimentos e também no corpo humano (Frankel e Finley, 2008). Estes testes têm se tornado ferramentas usuais e extremamente necessárias na seleção inicial de substâncias que possam ser utilizadas como fármacos, auxiliando os pesquisadores na avaliação da atividade de substâncias isoladas de produtos naturais, bem como obtidas de fontes sintéticas. Além disso, estes métodos podem auxiliar na escolha das espécies de planta ou animais para estudos químicos e farmacológicos, e comprovar a presença de substâncias antioxidantes em alimentos.

Visando proporcionar ao consumidor alimentos com maior grau de qualidade, existem diversas metodologias descritas na literatura para quantificação da oxidação durante o processo de armazenamento. Devido à larga divergência dos resultados de testes com antioxidantes naturais em alimentos, muitos protocolos e diretrizes têm sido estabelecidos no sentido de trazer ordem e concordância a este importante campo (Frankel e Finley, 2008).

3.10.1 Método de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH)

O método da atividade antioxidante pelo sequestro do radical DPPH, foi inicialmente proposto por Blois (1958), e tem sido amplamente utilizado para determinar a atividade antioxidante de alimentos (Thiansilakul et al., 2007; Je et al., 2009; Ngo et al., 2010; Bougatef et al., 2010; Liu et al., 2011). A molécula de DPPH é caracterizada como um radical livre estável em virtude do desemparelhamento do elétron na molécula. Este desemparelhamento confere à molécula uma coloração violeta, caracterizada por uma banda de absorção em 500 nm. Este ensaio se baseia na medida da capacidade antioxidante de uma determinada substância em sequestrar o radical DPPH (Figura 9), reduzindo-o a hidrazina.

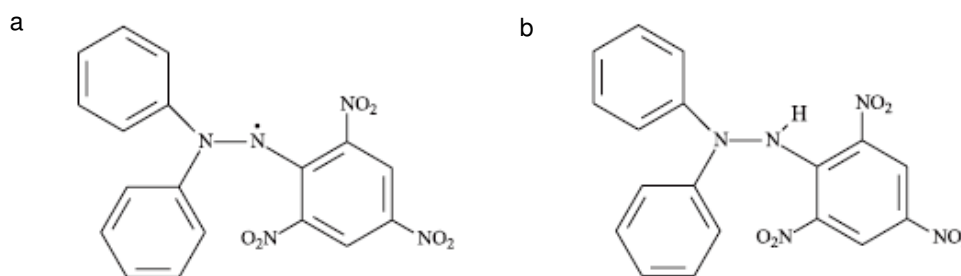


Figura 9. Formas radicalar (a) e não radicalar/reduzida (b) do DPPH. (Fonte: Rufino et al., 2007)

Quando uma determinada substância que age como doador de átomos de hidrogênio é adicionada a uma solução de DPPH, a hidrazina é obtida com mudança simultânea na coloração de violeta a amarelo pálido. Esta habilidade foi primeiramente avaliada espectroscopicamente por ressonância de elétron spin, uma vez que a intensidade do sinal do radical DPPH é inversamente relacionada com a concentração do antioxidante testado e o tempo de reação. Entretanto, o método de controle mais utilizado é o decaimento da absorbância no comprimento de onda, produzido pela adição do antioxidante a uma solução alcoólica do radical DPPH. Este método é considerado, do ponto de vista metodológico, um dos mais fáceis, precisos e reprodutivos na avaliação da atividade antioxidante (Alves et al., 2010).

3.10.2 Método de sequestro do radical hidroxila (OH•)

O radical hidroxil (OH•) é um dos mais deletérios radicais livres, pois sua meia-vida é muito curta e dificilmente pode ser sequestrado *in vivo*. Em experimentos *in vitro* pode ser sequestrado facilmente devido a sua alta reatividade, porém para que esse resultado se reproduza *in vivo* é necessário que sejam ministradas altas concentrações de antioxidante.

Este radical frequentemente ataca as moléculas por abstração de hidrogênio e pode ser gerado através da reação do H_2O_2 com metais de transição ou pela homólise da água por exposição à radiação ionizante (Sarma e Sharma, 1999). Um dos métodos específicos para determinar o sequestro do radical hidroxil é o ensaio empregando-se a 2-deoxirribose. Neste ensaio, $OH\cdot$ é gerado pela reação do cloreto férrico ($FeCl_3$) e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) na presença de ascorbato, que reage para formar Ferro (II)-EDTA juntamente com ascorbato oxidado. O H_2O_2 reage com Ferro (II)-EDTA para formar Ferro (III)-EDTA e $OH\cdot$ através da reação de Fenton. O radical formado pode então reagir com 2-deoxirribose para formar produtos que, sob aquecimento com ácido tiobarbitúrico (TBA) em pH baixo, apresentam coloração rosada, sendo monitorado por espectrofotometria na região do visível (532 nm). Substâncias que tenham propriedades antioxidantes podem competir com a 2-deoxirribose pelo radical, produzindo uma diminuição na intensidade da coloração (Gutteridge e Halliwell, 1988).

3.10.3 Método Sequestro do radical 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS⁺)

O ensaio do sequestro do radical 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) é baseado na inibição, por antioxidantes, da absorvância do cátion radical ABTS⁺ que tem um espectro de absorção característico de comprimento de onda longo com absorção máxima principal a 415 nm e absorções máximas secundárias em 660, 734 e 820 nm. Modificação do método foi introduzida por uma técnica de descoloração em que o radical é gerado diretamente em uma forma estável usando persulfato de potássio (Re et al., 1999). Posteriormente, o radical formado é misturado com o antioxidante no meio reacional (Figura 10) e a percentagem de inibição da absorvância a 734 nm é calculada e plotado como uma função da concentração de antioxidantes.

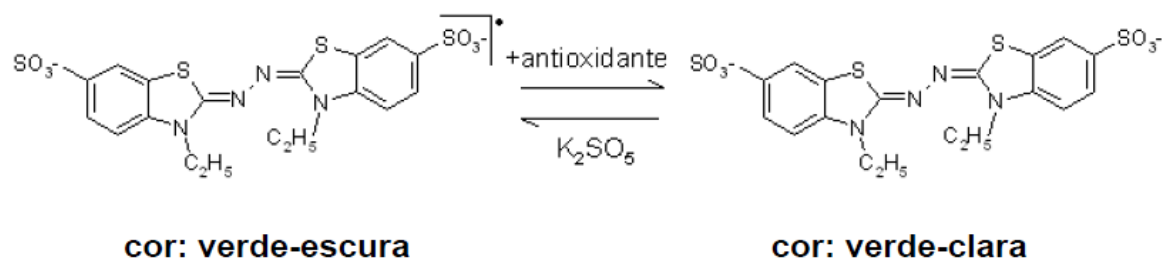


Figura 10. Estabilização do radical ABTS⁺ por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio (Fonte: Rufino et al., 2007)

O uso habitual de Trolox como um padrão, permite que o ensaio seja chamado de atividade antioxidante em equivalentes de Trolox (TEAC), ou seja, a concentração da solução de Trolox (mmol/L) com um potencial antioxidante equivale a 1,0 mmol/L da substância em estudo. Como o cátion radical ABTS⁺ pode ser dissolvido em meio aquoso e etanol acidificado, este ensaio é capaz de testar a atividade antioxidante dos compostos hidrofílicos e lipofílicos (Kuskoski, et al., 2005).

3.10.4 Inibição da peroxidação lipídica

Neste ensaio, os hidroperóxidos gerados durante a oxidação do ácido linoléico reagem com o sulfato ferroso, dando origem ao sulfato férrico e, em seguida, ao tiocianato férrico, de cor vermelho sangue, que é monitorado espectrofotometricamente a 500nm (Nascimento et al., 2010). Segundo Chen et al. (1996), o decréscimo da densidade ótica causada por uma substância antioxidante revela a interrupção da oxidação em decorrência da não disponibilidade do ácido linoléico no meio da reação e do surgimento de produtos secundários oriundos da degradação dos hidroperóxidos.

3.10.5 Poder Redutor

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

3.11 Separação de compostos bioativos usando ultrafiltração por membranas

Uma membrana pode ser definida como uma barreira semipermeável, que separa duas fases e restringe o transporte de uma ou várias espécies químicas de maneira específica. O transporte de espécies selecionadas pela membrana é alcançado pela aplicação de uma força motriz através da mesma. Esta pode resultar de gradientes de pressão, concentração, potencial elétrico ou temperatura. O processo de separação por

membranas é caracterizado pelo fato do fluxo de alimentação originar dois fluxos, o do retentado (concentrado) e o do permeado, o que implica que, um dos fluxos será o resultado da separação (produto) (Tullio, 2007). A Figura 11 ilustra o processo de separação por membranas.

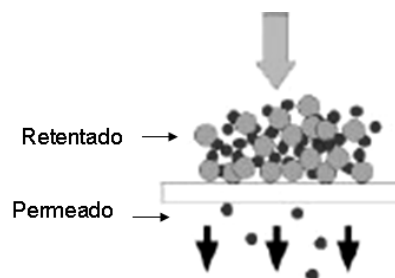


Figura 11. Correntes do processo de separação por membranas (Fonte: Montagnoli, 2005)

As membranas geralmente são especificadas através de seu peso molecular de corte ou “cut off”. O “cut off” de uma membrana é definido como sendo o peso molecular da proteína globular que é 90% retida pela membrana (Rosenberg, 1995). Levantamentos bibliográficos têm mostrado até o momento que pesquisadores vêm usando uma faixa de permeabilidade das membranas de ultrafiltração, compreendida geralmente entre 1000 e 30.000 Da, para fins de estudos de separação de produtos bioativos.

Os sistemas de ultrafiltração utilizam membranas com peso molecular de corte variando, geralmente, de 1-200 kDa e tamanho de poro de aproximadamente 0,01 μ m. Água e solutos de baixo PM fluem através da membrana, constituindo o “permeado” (Rosenberg, 1995). O grau de concentração é determinado pelo aumento da viscosidade do retentado, sendo que existe um limite de concentração, diretamente relacionado ao volume mínimo de retentado necessário para alimentar o sistema, sendo definido pelo tipo de equipamento e condições de processamento, utilizados. A ultrafiltração permite concentrar solutos de alto peso molecular presentes em soluções sem aplicação de calor e sem uso de condições físicas e/ou químicas severas. Para as proteínas isso significa concentrar, sem qualquer modificação drástica na estrutura e na funcionalidade. Assim é possível concentrar as proteínas com o mínimo de desnaturação, sem perda significativa de atividade. Durante a ultrafiltração, com a retirada do permeado através da membrana, pode ocorrer a formação de uma camada secundária dos componentes retidos sobre a superfície da membrana. Este fenômeno é conhecido como concentração polarizada ou, se a camada superficial se torna aderente à membrana, o termo “fouling” é mais apropriado, levando à queda gradual do fluxo, diminuição do rendimento do processo e da eficiência de separação na membrana. Isto é causado principalmente pela precipitação de sais e/ou adsorção de proteínas na superfície e dentro dos poros da membrana (Carié et al., 2000).

O processo de separação por membranas vem sendo empregado em diferentes áreas industriais, proporcionando as seguintes vantagens: baixo consumo energético, não requer aditivos químicos, são sistemas compactos e de fácil ampliação de escala, apresentam a possibilidade de emprego em sistemas contínuos e podem ser combinados com outros processos de separação. São exemplos de aplicações já estabelecidas a separação de proteínas, a clarificação de líquidos, a concentração de produtos e a esterilização a frio (Kelly et al., 2000).

Membranas com “cut off” de baixo peso molecular, como por exemplo, 500, 1000 e 3000 Da são recomendadas para concentrar pequenos peptídeos com diferentes bioatividades a partir de frações de elevado peso molecular. Sistemas de ultrafiltração, equipados com membranas de peso molecular de corte apropriadas, são eficientes na separação de peptídeos com pesos moleculares desejados a partir de hidrolisados de pescado. Esse é um método comum que usa uma classe de enzimas que permitem digestão enzimática sequencial para obter peptídeos com funcionalidade (Kim e Mendis, 2006).

3.12 Desmineralização

Ossos, espinhas, peles e cabeças de pescado, separados durante o processamento podem servir de uma fonte adicional de proteínas, principalmente de colágeno. Os ossos e espinhas são um dos principais subprodutos rendendo cerca de 15% do peso do animal. Eles contêm colágeno, uma proteína do tecido conjuntivo, bem como sais minerais, principalmente fosfato de cálcio e carbonato. É possível obter colágeno nativo a partir de ossos após prévia desmineralização. O processo de desmineralização tem por objetivo a retirada de materiais inorgânicos presentes na amostra (Moura et al., 2006). Para dissolver os sais minerais a partir de elementos ósseos HCl é geralmente utilizado. EDTA também pode ser empregado para desmineralização, uma vez que forma sais solúveis com muitos metais e minerais (Skierka et al., 2007). O colágeno possui uma ampla variedade de aplicações na indústria farmacêutica, cosmética, de materiais biomédicos, de alimentos, entre outros (Kittiphattanabawon et al., 2005).

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIA - **Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação** - Compêndio da Legislação de Alimentos: Consolidação das Normas e Padrões de Alimentos, 7ª ed., São Paulo, v.1, 1999.

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.

BAILEY, A. E.; **Bailey's Industrial Oil and Fat Products**, 5^a ed., John Wiley: New York, v. 3, 1996.

BARBUT, S. **Poultry products processing: an industry guide**. Ed. CRC Press, Florida, USA, 2002.

BARRETO, S. L. T.; FERREIRA, W. M.; GONÇALVES, T. M. Níveis de proteína e de vitamina E para matrizes de frango de corte. 2. Efeito sobre a concentração de α -tocoferol na gema e nos tecidos e balanço de nitrogênio. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n. 2, 1999.

BELLO, J. Los alimentos funcionales o nutraceuticos. I Nueva gama de productos en la industria alimentaria. **Alimentaria**, v. 32, n. 265, p. 25-30, 1995.

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

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

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Introdução à química de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Varela, 2003. 238p.

BONIFER, L. B.; FRONING, G. W. Chicken skin composition as affected by aqueous washing. **Journal of Food Science**, v. 61, n. 5, p. 895-898, 1996.

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

BOTTERWECK, A. A. M.; VERHAGEN, H.; GOLDBOHM, R. A.; KLEINJANS J.; VAN DEN

BRANDT, P. A. Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: results from analyses in the Netherlands cohort study. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, n. 7, p.599-605, 2000.

BOZA, J. J.; MOËNNOZ, D.; VUICHOUD, J.; JARRET, A. R.; GAUDARD-DE-WECK, D.; BALLÈVRE, O. Protein hydrolysate vs free amino acid-based diets on the nutritional recovery of the starved rat. **European Journal of Nutrition**, v. 39, n. 6, p. 237-243, 2000.

BRASIL. **Ministério da Agricultura e do Abastecimento**. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Peixe Fresco. Portaria nº 185 de 13 de maio de 1997. Disponível em: <<http://www.engetecno.com.br>>. Acesso em 08 de março de 2009.

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 1.004 de 11 de dezembro de 1998: Atribuição de função de aditivos, aditivos e seus limites máximos de uso para a categoria 8. Carne e produtos cárneos. Brasília, 1998. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/legis/index>>. Acesso em: 21 de dezembro de 2010.

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

CÂNDIDO, L. M. B.; SGARBIERI, V. C. Enzymatic hydrolysis of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) myofibrillar proteins: effects on nutritional and hydrophilic properties. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 83, p. 937-944, 2003.

CARIÉ, M. D.; MILANOVIÉ, S. D.; KRISTIÉ, D. M.; TEKIÉ, M. N. Fouling of inorganic membranes by adsorption of whey proteins. **Journal of Membrane Science**, v. 165, n. 5, p. 83-88, 2000.

CHABANCE, B.; MARTEAU, P.; RAMBAUD, J. C.; MIGLIORE-SAMOUR, D.; BOYNARD, M.; PERROTIN, P.; GUILLET, R.; JOLLÈS, P.; FIAT, A. M. Casein peptide release and passage to the blood in humans during digestion of milk or yogurt. **Biochimie**, v. 80, n. 2, p. 155-165, 1998.

CHEN, H-M.; MURAMOTO, K.; YAMAUCHI, F.; NOKIHARA, K. Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soyabean

protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 2619-2623, 1996.

COSTA, E. L. Efeito do processamento térmico e enzimático na obtenção de hidrolisados do isolado protéico do soro de leite com atividade anti-hipertensiva. **Tese de Doutorado**. Universidade Estadual de Campinas. FEA, 2004, 115p.

COSTA, E. L.; GONTIJO, J. A. R.; NETTO, F. M. Effect of heat and enzymatic treatment on the antihypertensive activity of whey protein hydrolysates. **International Dairy Journal**, v.17, n. 7, p. 632-640, 2007.

DAS NEVES, R. A. M.; CAMPOS, T.; MARQUEZ, U. M. L. Modulação da Pressão Arterial por Hidrolisados Protéicos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 1, p. 81-86, 2006.

DE FELICE, S. L. The nutraceutical revolution: its impact on food industry. **Trends in Food Science and Technology**, v. 6, n. 2, p. 59-61, 1995.

DINIZ, F. M.; MARTIN, A. M. Use of response surface methodology to describe the combined effects of pH, temperature and E/S ratio on the hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) muscle. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 31, p. 419-426, 1996.

ELIAS, R. J.; KELLERBY, S. S.; DECKER, E. A. Antioxidant Activity of Proteins and Peptides. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 48, p. 430-441, 2008.

FAO - **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, Fishery Statistics. Disponível em: <<http://www.fao.org/>>. Acesso em: 24 de outubro de 2009.

FOH, M. B. K.; QIXING, J.; AMADOU, I.; XIA, W.S. Influence of ultrafiltration on antioxidant activity of tilapia (*Oreochromis niloticus*) protein hydrolysate. **Advance Journal of Food Science and Technology**, v. 2, n. 5, p. 227-235, 2010.

FONKWE, L. G.; SINGH, R. K. Protein Recovery from Mechanically Deboned Turkey Residue by Enzymic Hydrolysis. **Process Biochemistry**, v. 31, n. 6, p. 605-616, 1996.

FRANKEL, E. D.; FINLEY, J. W. How to standardize the multiplicity of methods to evaluate natural antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 13, p. 4901-

4908, 2008.

GODOY FILHO, J. H. Aspectos tecnológicos de produtos empanados de frango. **Revista Nacional da Carne**, n. 246, p. 40-44, 1997.

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.

GUTTERIDGE J M.; HALLIWELL B. The deoxyribose assay: an assay both for 'free' hydroxyl radical and for site-specific hydroxyl radical production. **Biochemical Journal**, v. 253, p. 932-940, 1988.

HAIMOVICI, M.; ABSALONSEN, L.; VELASCO, G.; MIRANDA, L. V. 2006. Diagnóstico do estoque e orientações para o ordenamento da pesca de *Umbrina canosai* (Berg, 1895). In: ROSSI-WONGTSCHOWSKI, C. L. D. B.; ÁVILA-DA-SILVA, A. O.; CERGOLE, M. C. (Ed.) **Análise das Principais Pescarias Comerciais da Região Sudeste-Sul do Brasil: Dinâmica Populacional das Espécies em Exploração – II**. São Paulo: USP, p. 77-85.

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.

HOU, H.; LI, B.; ZHAO, X.; ZHANG, Z. LI, P. Optimization of enzymatic hydrolysis of Alaska pollock frame for preparing protein hydrolysates with low-bitterness. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, p. 421-428, 2011.

HUANG, S. C.; KUO, J. C. Concentrations and antioxidative activity of anserine and carnosine in poultry meat extracts treated with demineralization and papain. **Proceedings of the National Science Council, Repub China B**, v. 24, n. 4, p.193-201, 2000.

IBAMA/CEPERG - **Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis**; Centro de Pesquisa e Gestão dos Recursos Pesqueiros Lagunares e Estuarinos; Projeto Estatística Pesqueira – Desembarque de pescado no Rio Grande do Sul 2008: Rio Grande, 2009. 41p.

ITO, N.; HIROSE, M.; FUKUSHIMA, S.; TSUDA, H.; SHIRAI, T.; TATEMATSU, M. Studies on antioxidants: their carcinogenic and modifying effects on chemical carcinogenesis. **Food**

Chemistry and Toxicology, v. 24, p.1071-1082, 1986.

IUBMB - **International Union of Biochemistry and Molecular Biology** (NC-IUBMB). Disponível em: <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>>. Acesso em: 28 de março de 2011.

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

JE, J. Y.; PARK, P. J.; JUNG, W. K.; KIM, S. K. Isolation of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitor from fermented oyster sauce, *Crassostrea gigas*. **Food Chemistry**, v. 90, p. 809-814, 2005b.

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

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

KAHLON, T. S.; WOODRUFF, C. L. In vitro binding of bile acids by soy protein, pinto beans, black beans and wheat gluten. **Food Chemistry**, v. 79, n. 4, p. 425-429, 2002.

KELLY, P. M.; KELLY, J.; MEHRA, R.; OLDFIELD, D. J.; RAGGETT, E.; O'KENNEDY, B. T. Implementation of integrated membrane processes for pilot scale development of fractionated milk components. **Lait**, v. 80, p. 139-153, 2000

KIM, G. H.; JEON, Y. J.; BYUN, H. G.; LEE, Y. S.; KIM, S. K. Effect of calcium compounds from oyster shell bound skin gelatin peptide in calcium deficient rats. **Journal of the Korean Fisheries Society**, v. 31, p. 149-159, 1998.

KIM, S-K.; KIM, Y-T.; BYUN, H-G.; PARK, P-J.; ITO, H. Purification and Characterization of Antioxidative Peptides from Bovine Skin. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 34, n. 3, p. 219-224, 2001a.

KIM, S. K.; KIM, Y. T.; BYUN, H. G.; NAM, K. S.; JOO, D. S.; SHAHIDI, F. Isolation and characterization of antioxidative peptides from gelatin hydrolysate of Alaska pollack skin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 1984-1989, 2001b.

KIM, S. K.; MENDIS, E. Bioactive compounds from marine processing byproducts - A Review. **Food Research International**, v. 39, p. 383-393, 2006.

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

KITTIPHATTANABAWON, P.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; NAGAI, T.; TANAKA, M. Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). **Food Chemistry**, v. 89, p. 363-372, 2005.

KITTS, D. D. Antioxidant properties of caseinphosphopeptides. **Trends in Food Science and Technology**, v. 16, p. 549-554, 2005.

KRISTINSSON, H.G.; RASCO, B.A. Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical and Functional Properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 40, n.1, p. 43-81, 2000a.

KRISTINSSON, H. G.; RASCO, B. A. Biochemical and functional properties of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle hydrolyzed with various alkaline proteases. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 48, p. 657-666, 2000b.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A.G.; TRONCOSO, A. M. Métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 726-732, 2005.

LAHL, W. J.; BRAUN, S.D. Enzymatic Production of Protein Hydrolysates for Food Use. **Food Technology**, v. 48, n. 10, p. 68-71, 1994.

LEHNINGER, A. L. **Princípios de bioquímica**. 2ª edição, Ed. Sarvier, São Paulo, 1995, 975p.

LI, X. X.; HAN, L. J.; CHEN, L. J. In vitro antioxidant activity of protein hydrolysates prepared from corn gluten meal. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 88, n.9, p.1660-1666, 2008.

LIU, J-H.; TIAN, Y-G.; WANG, Y.; NIE, S-P.; XIE, M-Y.; ZHU, S. WANG, C-Y.; ZHANG, P. Characterization and in vitro antioxidation of papain hydrolysate from black-bone silky fowl (*Gallus gallus domesticus* Brisson) muscle and its fractions. **Food Research International**, v. 44, p. 133-138, 2011.

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

MEISEL, H. Overview on milk protein-derived peptides. **International Dairy Journal**, v. 8, n.5/6, p. 363-373, 1998.

MELO, E. A.; GUERRA, N. B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 36, n. 1, p. 1-11, 2002.

MENDIS, E.; RAJAPAKSE, N.; KIM, S. K. Antioxidant properties of radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 581-587, 2005a.

MENDIS, E.; RAJAPAKSE, N.; BYUNB, H.G.; KIM, S. K. Investigation of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin gelatin peptides for their in vitro antioxidant effects. **Life Sciences**, v. 77, p. 2166-2178, 2005b.

MONTAGNOLI, V. Filtração em linhas de pintura por eletrodeposição. **Revista Meio Filtrante**, ano 4, edição n° 17, novembro/dezembro de 2005.

MORAES, M. C. S. Estudo comparativo da gordura de capote, galinha caipira e frango-de-granja. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n.1, p. 15-24, 1987.

MOREIRA, R. S. R.; ZAPATA, J. F. F.; FUENTES, M. F. F.; SAMPAIO, E. M.; MAIA, G. A.

Efeito da restrição de vitaminas e minerais na alimentação de frangos de corte sobre o rendimento e a composição da carne. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 1, 1998.

MOURA, C.; MUSZINSKI, P.; SCHMIDT, C.; ALMEIDA, J.; PINTO, L. Quitina e quitosana produzidas a partir de resíduos de camarão e siri: avaliação do processo em escala piloto. **Vetor**, Rio Grande, v. 16, n.1/2, p. 37-45, 2006.

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.

NEIVA, G. S. Sumário sobre a pesca mundial, 2005. Disponível em: <<http://www.pescabrasil.com.br/comercial/artigo2.asp>> Acesso em: 03 de novembro de 2010.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger principles of biochemistry. 4ª edição, W. H. Freeman, New York, 2004, 1119p.

NEVES, R. A. M.; MIRA, N. V. M. DE; MARQUEZ, U. M. L. Caracterização de hidrolisados enzimáticos de pescado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 1, p. 101-108, 2004.

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

ONODENALORE, A. C.; SHAHIDI, F. Protein dispersions and hydrolysates from shark (*Isurus oxyrinchus*). **Journal of Aquatic Food Production Technology**, v. 5, p. 43, 1996.

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

OLIVEIRA, M. S. Inibição de crescimento fúngico e sua produção de micotoxinas por compostos fenólicos presentes em vegetais e seus resíduos. **Dissertação de Mestrado**, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, 2005.

ORDÓÑEZ, J. A. **Tecnología de Alimentos – Alimentos de origem animal, vol. 2**, Editora Artmed, 2005.

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

PARK, P. J.; JUNG, W. K.; NAM, K. S.; SHAHIDI, F.; KIM, S.K. Purification and characterization of antioxidative peptides from protein hydrolysates of lecithin-free egg yolk. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, n. 78, p. 651-656, 2001.

PARK, E. Y.; MURAKAMI, H.; MORI, T.; MATSUMURA, Y. Effects of protein and peptide addition on lipid oxidation in powder model system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p.137-144, 2005.

PENNA. E. W.; LILIENFELD, C.; VINAGRE, J.; FUENTES, A. Algunas propiedades funcionales de extensores carneos. **Fleischwirtschaft International**, v. 2, p. 14-16, 1991.

POKORNY, J. Natural antioxidants for food use. **Trends in Food Science and Technology**, v. 2, p. 223-227, 1991.

RAFECAS, M.; GUARDIOLA, F.; ILLERA, M.; CODONY, R.; BOATELLA, J. Liquid chromatographic determination of phenolic antioxidants in bakery products. **Journal of Chromatography A**, v. 822, p. 305-309, 1998.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, 2006.

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.

RICHARDS, N. S. P. S. Soro lácteo: Perspectivas industriais e proteção ao meio ambiente. **Food Ingredients**, v. 3, n. 17, p. 20-27, 2002.

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 e Tecnologia de**

Alimentos, v. 27, n. 1, p. 53-60, 2007.

ROSA, C. S. Estudo das propriedades funcionais do colágeno obtido da pele de frango. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de Santa Maria, 2000.

ROSENBERG, M. Current and future applications for membrane processes in the dairy industry. **Trends in Food Science and Technology**, v. 6, p. 12-19, 1995.

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

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, 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.

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

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

SANCHEZ-MORENO, C. Compuestos polifenólicos: Efectos fisiológicos - Actividad antioxidante. **Alimentaria**, v. 239, p. 29-40, 2002.

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.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos: Propriedades, Degradações e Modificações**. São Paulo: Livraria Varela, 1996.

SHAHIDI, F.; KAMIL, Y. V. A. J. Enzymes from fish aquatic invertebrates and their application in the food industry. **Food Science and Technology**, v. 12, p. 435-464, 2001.

SHAHIDI, F.; JANITHA, P. K.; WANASUNDARA, P. D. Phenolic antioxidants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 32, n. 1, p. 67-103, 1992.

SHIMIZU, M. Modulation of intestinal functions by food substances. **Nahrung**, v. 43, n.3, p. 154-158, 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.

SUETSUNA, K. Antioxidant Peptides from the Protease Digest of Prawn (*Penaeus japonicus*) muscle. **Marine Biotechnology**, v. 2, p. 5-10, 2000.

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.

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.

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

TULLIO, L. M. Isolamento e caracterização de glicomacropéptido do soro de leite. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2007, 81p.

UBABEF - **União Brasileira de Avicultura** - O frango pelo mundo. (Disponível em: <<http://www.brazilianchicken.com.br/industria-avicola/o-frango-pelo-mundo.php>>. Acesso em 20 janeiro de 2011.

VELIOGLU, Y. S.; MAZZA, G.; GAO, L.; OOA, B. D. Antioxidant activity and total phenolic

in selected fruits, vegetables, and grain products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 4113-4117, 1998.

VIOQUE, J.; CLEMENTE, A.; PEDROCHE, J.; YUST, M. M.; MILLÁN, F. Obtención y aplicaciones de hidrolizados protéicos. **Grasas y Aceites**, v. 52, n. 2, p. 132-136, 2001.

VIOQUE, J.; PEDROCHE, J.; YUST, M. M.; LQARI, H.; MEGÍAS, C.; GIRÓN-CALLE, J.; ALAIZ, M.; MILLÁN, F. Peptídeos Bioativos em Proteínas Vegetais de Reserva. **Brazilian Journal of Food Technology, III JIPCA**, n. 16, p. 99-102, 2006.

WALZEM R. L. Produtos e bebidas nutricionais. **Propriedades benéficas à saúde das proteínas de soro e frações de soro**. Monografia, A & M University, Texas, USA, 2007.

WHITAKER, R. **Principles of Enzymology for Food Science**. Marcel Decker, N.Y., 1994.

YEN, G-C.; CHEN, H-Y. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, n. 1, p. 27-32, 1995

5 DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

Esta tese está dividida em quatro artigos científicos:

Artigo 1: Estudo da desmineralização de ossos de peixe e de frango

Artigo 2: Características e atividade antioxidante de hidrolisados protéicos de ossos de peixe e de frango

Artigo 3: Propriedades antioxidantes e bioquímicas de hidrolisados protéicos preparados a partir de músculo de peixe e de frango

Artigo 4: Fracionamento de hidrolisados protéicos de peixe e frango utilizando ultrafiltração por membranas: investigação da atividade antioxidante

6 ESTUDO DA DESMINERALIZAÇÃO DE OSSOS DE PESCADO E DE FRANGO

ESTUDO DA DESMINERALIZAÇÃO DE OSSOS DE PESCADO E DE FRANGO

Graciela Salete Centenaro, Myriam Salas-Mellado, Carlos Prentice-Hernández

RESUMO

Pele, ossos, espinhas, entre outros, separados durante o processamento de produtos cárneos podem ser uma boa fonte de proteína, especialmente de colágeno. Para obtenção de colágeno nativo a partir de ossos é necessário um tratamento prévio de desproteínização e desmineralização. Portanto, o objetivo deste trabalho foi determinar os melhores parâmetros para a desmineralização de ossos de pescado e frango utilizando soluções de HCl e EDTA um complexante de íons metálicos. O melhor efeito da desmineralização foi obtido com solução de HCl 1,0 mol/L. Após 48 h de extração, 99,4 e 95,4% das substâncias minerais foram solubilizadas para os ossos de pescado e para ossos de frango, respectivamente. Paralelamente, a menor perda de colágeno também foi observada nessas condições. O processo realizado empregando soluções de EDTA foi menos eficaz do que com solução de HCl. Após 48 h de extração com EDTA 0,1 mol/L, 37,5 e 32,4% dos compostos minerais foram removidos dos ossos de pescado e dos ossos de frango, respectivamente. Uma maior eficiência foi alcançada com solução de EDTA 0,5 mol/L. O rendimento do processo foi de cerca de 66,6% a partir dos ossos de pescado e 70,6% a partir os ossos de frango. A desmineralização com EDTA não provocou perda de colágeno.

Palavras-chave: frango; pescado; ossos; desmineralização; colágeno

ABSTRACT

Skins, bones, backbones, among others, that were separated during the meat products processing can be a good source of proteins, especially collagen. To obtain native collagen, previous deprotenization and demineralization treatment of bones is necessary. Therefore, the aim of this work was to determine best parameters for demineralization of fish and chicken bones using HCl solutions, and EDTA a complexing metal ions. The best demineralization effect was achieved with 1.0 mol/l HCl solution. After 48 h of extraction, 99.4 and 95.4% of mineral substances were solubilized, respectively, for fish and chicken bones. In parallel, the smallest loss of collagen, was also observed in these conditions. The process conducted using EDTA solutions was less effective than that with HCl solutions. After 48 h extraction in 0.1 mol/l EDTA only about 37.5 and 32.4% of mineral compounds were removed from fish and chicken bones, respectively. Somewhat higher efficiency was reached with 0.5 M EDTA solution. The yield of the process reached about 66.6% for fish and 70.6% for chicken bones and demineralization with EDTA did not cause loss of collagen.

Keywords: chicken; fish; bone; demineralization; collagen

6.1 INTRODUÇÃO

Dados estatísticos indicam que existe no Brasil uma oferta anual de subprodutos de origem animal (ossos, cascos, chifres, gorduras, aparas de carne, pele e vísceras) equivalente a 8,8 milhões de toneladas, com potencial para ser transformado em produtos de valor agregado, movimentando aproximadamente R\$ 3,5 bilhões (SINCOBESP, 2010).

O colágeno, uma proteína fibrosa que está presente nesses subprodutos de origem animal, desempenha um papel fundamental na manutenção da estrutura de vários tecidos e órgãos, e tem sido amplamente aplicado em indústrias de alimentos, cosmética e farmacêutica, por apresentar boas propriedades biológicas e funcionais (Miller, 1983; Rocha et al., 2002; Olsen et al., 2003; Zelechowska et al., 2010). Por outro lado, grande parte dos subprodutos ricos em proteínas, são ainda usados para produzir farinhas para ração animal ou fertilizantes e, quando não aproveitados, são descartados poluindo o meio ambiente. Diante disso, a recuperação e modificação dos resíduos assumem grande importância, uma vez que permitiriam não só diminuir o custo dos insumos e minimizar os problemas de poluição ambiental, como também criar novos ingredientes e oferecer no mercado, produtos mais variados e de menor preço.

Para a eficaz separação do colágeno presente nos subprodutos sólidos, alguns componentes, como lipídios, cinzas e proteínas não-colagenosas, devem ser removidos (Nagai et al. 2000; Kittiphattanabawon et al., 2005), pois a presença destes prejudica as propriedades físico-químicas dessa proteína.

O colágeno de pescado, especialmente de espécies de águas frias, difere do de outros animais devido ao menor conteúdo dos aminoácidos prolina e hidroxiprolina (Park, 2000) ou ainda pela sua elevada solubilidade em ácidos diluídos (Kittiphattanabawon et al., 2005). Para dissolver os sais minerais a partir de elementos ósseos é geralmente usado ácido clorídrico (HCl). EDTA também pode ser usado para essa finalidade, uma vez que forma complexos solúveis com muitos metais e minerais (Skierka et al., 2006). Vários estudos têm mostrado o aproveitamento de subprodutos para produção de colágeno e sua aplicação na obtenção de diferentes compostos com propriedades nutritivas, funcionais e bioativas (Nagai e Suzuki, 2000; Morimura et al., 2002; Sadowska et al., 2003; Ogawa et al., 2004; Kittiphattanabawon et al., 2005; Li et al., 2007; Li et al., 2009; Zelechowska et al., 2010).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi determinar a melhor condição para a desmineralização de ossos de pescado e ossos de frango utilizando soluções de HCl e EDTA simultaneamente, com a menor perda de colágeno, para que estes posteriormente sejam utilizados como fonte efetiva na elaboração de diversos produtos.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 Matérias-primas

Os ossos de peixe, doados pela indústria Pescall S/A, localizada na cidade de Rio Grande, RS-Brasil, foram separados manualmente do músculo da castanha (*Umbrina canosai*) após o processo de filetagem. Os ossos de frango, doados pela Cia. Minuano de Alimentos localizada na cidade de Lajeado, RS-Brasil, foram separados do músculo mecanicamente. Ambas as matérias-primas foram trituradas em um moinho de facas (Thomas Scientific – modelo Wiley Mill - EUA) e armazenadas a -20 °C em sacos de polietileno até o momento do uso.

6.2.2 Remoção de proteínas não-colagenosas

As proteínas não-colagenosas foram removidas dos ossos de acordo com o procedimento descrito por Skierka et al. (2006), com algumas modificações. As amostras foram misturadas com solução de NaOH 0,1 mol/L (1:2, p/v), homogeneizadas a 600 rpm em homogeneizador eixo-hélice (IKA®, modelo RW28, Staufen, Alemanha) por 5 min e mantidas a 4 °C. Após 24 h a mistura foi centrifugada a 9000 x g (Biosystems, modelo MPW-350/350R, Brasil) durante 20 min e o sobrenadante foi descartado. Esse procedimento foi novamente repetido. O material sedimentado foi lavado com água destilada fria, para eliminar o NaOH e as proteínas musculares remanescentes, até a água de lavagem atingir pH neutro e então novamente centrifugado a 9000 x g (Biosystems, modelo MPW-350/350R, Brasil).

6.2.3 Processo de desmineralização

Os ossos foram desmineralizados de acordo com Skierka et al. (2007), com algumas modificações, usando soluções de HCl 0,5 e 1,0 mol/L ou EDTA 0,1 e 0,5 mol/L (1:4, p/v). As amostras foram homogeneizadas a 600 rpm (IKA®, modelo RW28, Staufen, Alemanha) por 2 min e mantidas por 48 h a 4 °C com mudança da solução após 24 h. Os ossos desmineralizados foram então filtrados em tecidos de algodão e armazenados sob congelamento a -20 °C em sacos de polietileno sua utilização. O rendimento da desmineralização foi calculado através da equação 1:

$$W = (A-B)/A \times 100 \quad (1)$$

onde: W = rendimento da desmineralização dos ossos (%); A = massa de cinzas na matéria-prima (%); B = massa de cinzas na amostra desmineralizada (%).

6.2.4 Composição proximal das amostras

O conteúdo de umidade, peso seco, cinzas, lipídios e nitrogênio total foram determinados de acordo com metodologia da AOAC (1995). O conteúdo de proteína foi calculado usando o fator de conversão de nitrogênio de 5,5.

6.2.5 Determinação de Hidroxiprolina

O conteúdo de hidroxiprolina foi determinado após hidrólise das amostras com HCl 6,0 mol/L a 110 °C por 8 h sob refluxo, de acordo com metodologia descrita por Della Torre et al. (2004). A hidroxiprolina oxidada a pirrol pela cloramina T em tampão citrato-acetato pH 6,0, converte-se em um complexo avermelhado pela reação com o reagente de Ehrlich (p-dimetilaminobenzaldeído em ácido perclórico/2-propanol). A absorbância foi medida a 558 nm e os resultados foram calculados a partir de uma curva de calibração de hidroxiprolina.

A perda de colágeno (%) foi determinada como a taxa de hidroxiprolina presente nos ossos após a desmineralização com soluções de HCl ou EDTA, em relação a sua concentração inicial na matéria-prima.

6.2.6 Análise Estatística

Todas as determinações foram realizadas em triplicata. Os valores médios para alguns parâmetros foram comparados através de análise de variância (ANOVA) com o auxílio do programa STATISTICA® versão 6.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, EUA). As diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os resultados foram identificadas usando teste de Tukey.

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.3.1 Composição proximal dos ossos de castanha e de frango

Na Tabela 1 está apresentada a composição proximal dos ossos de pescado e frango. Os resultados da composição química dos ossos de pescado são semelhantes aos valores encontrados para polaca do Alaska (Hou et al., 2011). O valor de hidroxiprolina

(b.u.) para os ossos de frango *in natura* (7,5 mg/g) foi maior que para os ossos de pescade (4,8 mg/g). Valores semelhantes foram relatados com “bigeye snapper” no trabalho de Kittiphattanabawon et al. (2005). Segundo a AOAC (1995), a hidroxiprolina é quantitativamente determinada como medida do material colagenoso. O conteúdo de colágeno (b.u.) nas matérias-primas foi de 3,9 e 6,0% para os ossos de pescade e de frango, respectivamente. Levando em consideração a proporção de colágeno na proteína total, pode-se avaliar que os ossos de pescade e os ossos de frango continham 37,7 e 27,0% (b.s.) de proteínas não-colagenosas, peptídeos e aminoácidos livres, respectivamente. Dessa forma, as proteínas não-colagenosas podem ser recuperadas em grande parte por extração alcalina. O restante do peso seco consiste de cinzas e de lipídios.

Tabela 1. Composição proximal dos ossos de pescade e de frango.

Componente	Concentração (%) ^a			
	Matéria-prima		Após desproteínização	
	Pescade	Frango	Pescade	Frango
Umidade	71,0 ± 1,5	55,2 ± 1,3	71,5 ± 1,8	62,5 ± 1,5
Proteína (N x 5,5) (b.u.)	15,1 ± 0,9	18,1 ± 0,9	12,6 ± 0,9	13,8 ± 0,9
Cinza (b.u.)	13,3 ± 0,6	15,9 ± 1,7	14,9 ± 0,6	21,0 ± 1,7
Lipídios (b.u.)	1,6 ± 0,3	10,7 ± 0,8	0,9 ± 0,4	2,7 ± 0,8
Colágeno (b.u.)	3,9 ± 0,4	6,0 ± 0,2	7,4 ± 0,7	9,1 ± 0,9

^a Valores médios ± desvio padrão de três repetições (b.u. = base úmida).

O colágeno é a única proteína que contém quantidade relativamente elevada e constante de hidroxiprolina, sendo este aminoácido utilizado para quantificar o colágeno presente em um tecido (Pardi et al., 1993; Price e Schweigert, 1994). A Figura 1 representa a composição proximal (b.s.) dos ossos de pescade e de frango antes e após o processo de remoção das proteínas não-colagenosas. Após a desproteínização, os ossos de pescade e os ossos de frango apresentaram 52,4 e 56% de cinzas e 26 e 24,2% de colágeno (b.s.), respectivamente. Evidenciou-se um aumento no conteúdo de cinzas após o processo de desproteínização, indicando que o hidróxido de sódio não foi completamente removido durante o processo de lavagem para neutralização do pH. Além disso, as proteínas não-colagenosas aderidas às matérias-primas foram solubilizadas durante a desproteínização concentrando a fração de cada componente. Em relação ao teor de lipídios observou-se uma diminuição de 5,3 para 3,1% nos ossos de pescade e de 23,8 para 7,2% (b.s.) nos ossos de frango.

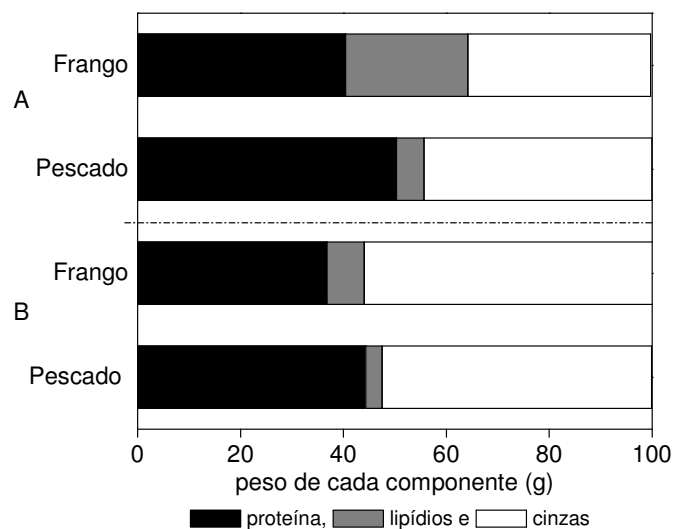


Figura 1. Composição proximal (%) dos ossos de peixe e frango antes (A) e após (B) o pré-tratamento de desproteinização (b.s.).

6.3.2 Desmineralização com solução de HCl

A etapa de desmineralização tem por objetivo reduzir o conteúdo de cinzas da matéria-prima (Moura et al., 2006). O rendimento da desmineralização depende da concentração de HCl e do tempo de processo. A quantidade de minerais dissolvidos aumentou com o aumento da concentração de HCl, dentro da faixa estudada (Figura 2). A maior porcentagem de minerais foi removida dos ossos de peixe e dos ossos de frango (99,4 e 95,4%, respectivamente) com tratamento em solução de HCl 1,0 mol/L, durante 48 h, trocando a solução após 24 h. Usando o mesmo procedimento, 92,1 e 81,6% dos minerais foram extraídos empregando solução de HCl 0,5 mol/L. Durante a desmineralização com HCl, pequena parte do colágeno, contido nas espinhas e nos ossos, foi solubilizada. Segundo Skierka et al. (2007), a solubilidade do colágeno depende da concentração do ácido. A perda de colágeno após 24 h de desmineralização em solução de HCl 0,5 mol/L foi 8,0 e 7,1% para os ossos de peixe e de frango, respectivamente. O intumescimento do material durante a desmineralização com solução de HCl 0,5 mol/L causou dificuldades durante a filtração da amostra.

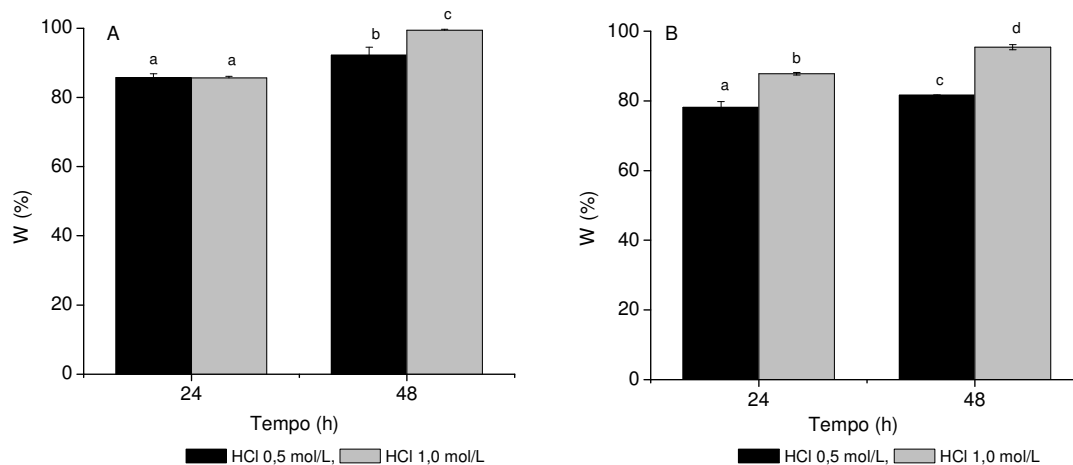


Figura 2. Efeito do tempo e da concentração de HCl no rendimento da desmineralização (W) dos ossos de peixe (A) e de frango (B). Letras iguais, não há diferença significativa ($p > 0,05$).

A desmineralização em solução de HCl 1,0 mol/L após 24 e 48 h apresentou menor perda na quantidade de colágeno que o HCl 0,5 mol/L, alcançando somente 2,2 e 3,1% para ossos de peixe e ossos de frango, respectivamente. Em meio ácido, (Tabela 2) o colágeno intumescce e isso facilita a sua solubilidade.

A diminuição da massa seca confirmou este fenômeno podendo ser verificado na Tabela 3. O colágeno foi consideravelmente menos solúvel na solução de HCl 1,0 mol/L. De acordo com Skierka et al. (2007), a hidratação do colágeno é máxima na faixa de pH 3-4.

No entanto, em pH muito baixo, como no caso dos ossos descalcificados com solução de HCl 1,0 mol/L (Tabela 2), a captação de água pelo colágeno é consideravelmente menor. A estrutura das fibras colagenosas se torna compacta e a solubilidade do colágeno é reduzida, pois há menos espaço para a água penetrar entre as macromoléculas.

Tabela 2. Valores de pH da mistura de ossos em soluções de HCl ou EDTA antes e após 24h de desmineralização.

Concentração da solução	Ossos de Pescado		Ossos de Frango	
	pH antes do processo	pH depois do processo	pH antes do processo	pH depois do processo
HCl 0,5 mol/L	0,8	2,1	1,8	3,7
HCl 1,0 mol/L	0,2	1,0	0,4	1,6
EDTA 0,1 mol/L	7,4	7,9	7,6	8,0
EDTA 0,5 mol/L	7,5	7,9	7,5	7,6

6.3.3 Desmineralização com solução de EDTA

A solução de EDTA foi menos eficiente na extração dos minerais que a solução de HCl. Durante 24 h de desmineralização, empregando soluções de EDTA 0,1 e 0,5 mol/L, aproximadamente 33 e 43% de minerais foram removidos dos ossos de pescada e 29 e 64% dos ossos de frango, respectivamente (Figura 3).

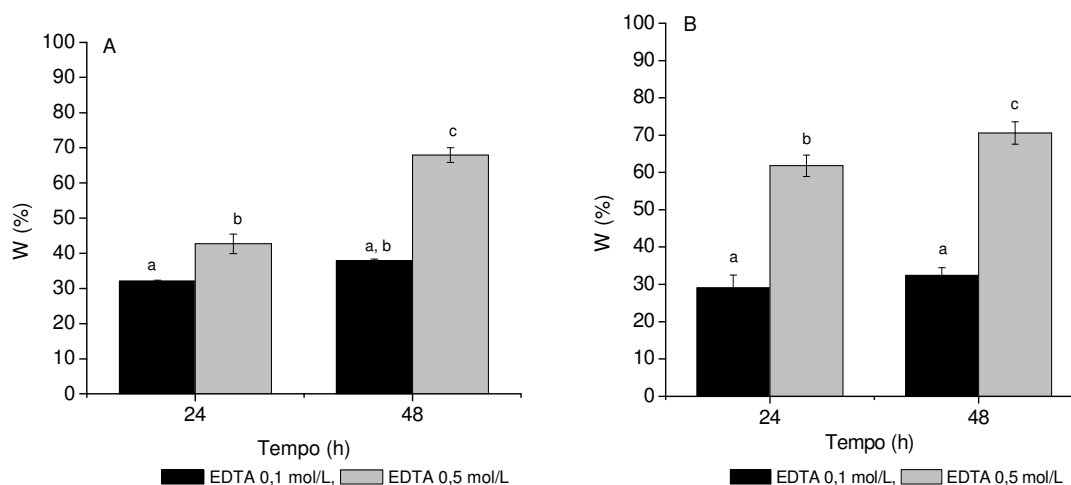


Figura 3. Efeito do tempo e da concentração de EDTA no rendimento da desmineralização (W) dos ossos de pescada (A) e dos ossos de frango (B). Letras iguais, não há diferença significativa ($p > 0,05$).

O aumento na eficiência de remoção de sais minerais foi obtido após 48 h com solução de EDTA 0,5 mol/L (cerca de 66 e 70%, para os ossos de pescada e de frango, respectivamente). A extensão do tempo de desmineralização, com solução de EDTA 0,1 mol/L, de 24 para 48 h trouxe pequenas alterações no conteúdo de cinzas, as quais não foram significativas ($p > 0,05$) para o rendimento do processo (Figura 3). Na presença de

EDTA, o material não sofreu inchaço e, conseqüentemente, a retenção de água nos ossos desmineralizados não foi dependente da concentração da solução (Tabela 3). Por estas razões, as dificuldades com a filtração, observadas durante a utilização da solução de HCl 0,5 mol/L, não ocorreu utilizando EDTA. Além disso, a desmineralização dos ossos com solução de EDTA não causou perda de colágeno. De acordo com Tonhi e Plepis (2002), a falta de solubilidade do colágeno é resultante do meio de extração ligeiramente alcalino (Tabela 2), sendo que o pH da solução corresponde ao ponto isoelétrico de colágeno, onde a solubilidade é menor.

Tabela 3. Peso seco dos ossos de pescado e de frango após a desmineralização.

Concentração da solução utilizada	Peso seco (%)			
	Ossos de pescado		Ossos de frango	
	24h	48h	24h	48h
HCl 0,5 mol/L	18,7 ± 1,25 ^d	17,0 ± 1,0 ^a	30,0 ± 0,3 ^a	28,8 ± 1,5 ^a
HCl 1,0 mol/L	27,7 ± 0,6 ^a	27,2 ± 1,2 ^b	36,6 ± 0,4 ^b	36,1 ± 0,2 ^b
EDTA 0,1 mol/L	26,0 ± 1,0 ^a	23,8 ± 0,7 ^c	34,0 ± 1,0 ^c	33,0 ± 1,0 ^c
EDTA 0,5 mol/L	27,0 ± 1,0 ^a	25,1 ± 1,0 ^{b,c}	35,3 ± 0,6 ^{b,c}	34,9 ± 1,0 ^{b,c}

* Valores médios ± desvio padrão de três repetições. Médias com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente ($p < 0,05$).

6.4 CONCLUSÃO

O maior rendimento da desmineralização dos ossos de pescado (99,4%) e dos ossos de frango (95,5%), foi alcançado utilizando solução de HCl 1,0 mol/L durante 48 h de extração e a perda de colágeno atingiu somente 2,2 e 3,1% para os ossos de pescado e de frango, respectivamente. Nas mesmas condições, mas com uso de solução de EDTA 0,5 mol/L, foi possível remover 66 e 70% de sais minerais dos ossos de pescado e de frango, respectivamente. Ao contrário das soluções com HCl, as soluções com EDTA não causaram perda de colágeno, porém a eficiência do processo foi menor.

6.5 AGRADECIMENTOS

Esse trabalho foi financiado pela CAPES e CNPq (Concessão 305055/2006-2), e pela Comunidade Européia, através do Projeto Chill-On (FP 6- 409 016333-2).

6.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC - **Association of Official Analytical Chemists. Official Methods Analysis of AOAC International**, Arlington, VA (USA), 1995. 16th ed.

DELLA TORRE, J. C. M.; LICHTIG, J.; BERAQUET, N. J. Validação do método espectrofotométrico para quantificação do aminoácido hidroxiprolina em conservas de carne. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 63, n.1, p. 35-42, 2004.

HOU, H.; LI, B.; ZHAO, X.; ZHANG, Z. LI, P. Optimization of enzymatic hydrolysis of Alaska pollock frame for preparing protein hydrolysates with low-bitterness. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, p. 421-428, 2011.

KITTIPHATTANABAWON, P.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; NAGAI, T.; TANAKA, M. Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). **Food Chemistry**, v. 89, p. 363-372, 2005.

LI, F.; JIA, D.; YAO, K. Amino acid composition and functional properties of collagen polypeptide from Yak (*Bos grunniens*) bone. **LWT - Food Science and Technology**, v.42, p. 945-949, 2009.

LI, B.; CHEN, F.; WANG, X.; JI, B.; WU, Y. Isolation and identification of antioxidative peptides from porcine collagen hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization–mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 102, p. 1135-1143, 2007.

MILLER, A. T. Collagen sausage casing. **US Patent, n° 4388331**, 1983.

MORIMURA, S.; NAGATA, H.; UEMURA, Y.; FAHMI, A.; SHIGEMATSU, T.; KIDA, K. Development of an effective process for utilization of collagen from livestock and fish waste. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 1403-1412, 2002.

MOURA, C.; MUSZINSKI, P.; SCHMIDT, C.; ALMEIDA, J.; PINTO, L. Quitina e quitosana produzidas a partir de resíduos de camarão e siri: avaliação do processo em escala piloto. **Vetor**, Rio Grande, v. 16, n.1/2, p. 37-45, 2006.

NAGAI, T.; SUZUKI, N. Isolation of collagen from fish waste material - skin, bone and fins.

Food Chemistry, v. 68, p. 277-281, 2000.

NAGAI, T.; WORAWATTANAMATEEKUL, W.; SUZUKI, N.; NAKAMURA, T.; ITO, T.; FUJIKI, K. Isolation and characterization of collagen from rhizostomous jellyfish (*Rhopilema asamushi*). **Food Chemistry**, v. 70, p. 205-208, 2000.

OGAWA, M.; PORTIER, R. J.; MOODY, M. W.; BELL, J.; SCHEXNAYDER, M. A.; LOSSO, J. N. Biochemical properties of bone and scale collagens isolated from the subtropical fish black drum (*Pogonia cromis*) and sheepshead seabream (*Archosargus probatocephalus*). **Food Chemistry**, v. 88, p. 495-501, 2004.

OLSEN, D.; YANG, C. L.; BODO, M.; CHANG, R.; LEIGH, S.; BAEZ, J.; D, PERALA, M.; HAMALAINEN, E. R.; JARVINEN, M.; POLAREK, J. Recombinant collagen and gelatin for drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, n. 12, p. 1547-1567, 2003.

PARDI, M. C.; SANTOS, I. F.; SOUZA, E. R.; PARDI, H. S. **Ciência, Higiene e Tecnologia da Carne**, v.1, Editora UFG, Goiânia, 1993.

PARK, J. W. **Surimi and surimi seafood**. 1st ed. Marcel Dekker, NY, USA, 2000, 500 p.

PRICE, J. F.; SCHWEIGERT, B.S. **Ciencia de le carne y de los productos cárnicos**. Editorial Acribia, Zaragoza, 1994.

ROCHA, L. B.; GOISSIS, G.; ROSSI, M. A. Biocompatibility of anionic collagen matrix as scaffold for bone healing. **Biomaterials**, v. 23, n. 2, p. 449-456, 2002.

SADOWSKA, M.; KOLODZIEJSKA, I.; NIECIKOWSKA, C. Isolation of collagen from the skins of Baltic cod (*Gadus morhua*). **Food Chemistry**, v. 81, p. 257-262, 2003.

SINCOBESP. **Revista Graxaria Brasileira**. Indústria de Farinha e Gordura Animal. Edição n° 15, ano 3, 66p, 2010. Disponível em: <<http://editorastilo.com.br/portal/pdf/revistas>>. Acesso em: 02 de junho de 2010.

SKIERKA, E.; SADOWSKA, M.; MAJEWSKA, J. Optimization of protein recovery from cod backbone. **Veterinary Medicine**, v. 62, p. 579-582, 2006.

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

TONHI, E.; PLEPIS, A. M. G. Obtenção e caracterização de blendas colágeno-quitosana. **Química Nova**, v. 25, n. 6, p. 943-948, 2002.

ZELECHOWSKA, E.; SADOWSKA, M.; TURK, M. Isolation and some properties of collagen from the backbone of Baltic cod (*Gadus morhua*). **Food Hydrocolloids**, v. 24, p. 325-329, 2010.

7 CARACTERÍSTICAS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE HIDROLISADOS PROTÉICOS DE OSSOS DE PESCADO E DE FRANGO

CARACTERÍSTICAS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE HIDROLISADOS PROTÉICOS DE OSSOS DE PESCADO E DE FRANGO

Graciela Salete Centenaro, Myriam Salas-Mellado, Carlos Prentice-Hernández

RESUMO

Foram hidrolisados ossos de castanha (*Umbrina canosa*) e de frango (*Gallus domesticus*) com diferentes proteases (Flavourzyme, α -Quimotripsina e Tripsina) a fim de obter peptídeos com atividade antioxidante. Os hidrolisados apresentaram diferentes graus de hidrólise e variação na atividade antioxidante. O poder antioxidante dos hidrolisados foi avaliado através da inibição da peroxidação do ácido linoléico, do sequestro do radical hidroxila, do sequestro do radical livre DPPH, do sequestro do radical livre ABTS e do poder redutor. Os hidrolisados de ossos de pescado (PF) e ossos de frango (FF) produzidos com Flavourzyme apresentaram elevada atividade de inibição da peroxidação lipídica (77,3 e 61,6% respectivamente) e moderada atividade de sequestro do radical DPPH, radical ABTS e radical hidroxila. A fração com peso molecular <3000 Da foi a principal constituinte dos seis hidrolisados, seguida pela fração com peso molecular <1000 Da. Os resultados desse estudo sugerem que hidrolisados protéicos de ossos de pescado e de frango são boas fontes de antioxidantes naturais. PF mostrou melhor desempenho e pode ser usado como agente antioxidativo.

Palavras-chave: atividade antioxidante; ossos; pescado; frango; hidrólise enzimática

ABSTRACT

Argentine croaker (*Umbrina canosa*) and chicken (*Gallus domesticus*) bones with different proteases (Flavourzyme, α -Chymotrypsin and Trypsin) were hydrolyzed in order to obtain antioxidant peptides. The hydrolysates had different degrees of hydrolysis and antioxidant activity. The antioxidant power of the hydrolysates was evaluated through inhibition of the peroxidation of linoleic acid, hydroxyl radical scavenging, DPPH free radical scavenging, ABTS free radical scavenging and reducing power. The hydrolysates of fish (PF) and chicken bones (FF) produced with Flavourzyme had high activity of lipid peroxidation inhibition (77.3 and 61.6% respectively) and moderate DPPH free radical scavenging, ABTS scavenging and hydroxyl radical scavenging activity. The fraction with molecular weight <3000 Da was the main constituent of the six hydrolysates followed by the fraction with molecular weight <1000 Da. The results of this study suggest that protein hydrolysates of fish and chicken bones are good sources of natural antioxidants. PF showed better performance and can be used as antioxidant substance.

Keywords: antioxidant activity; bones; fish; chicken; enzymatic hydrolysis

7.1 INTRODUÇÃO

A cada ano, uma quantidade considerável de subprodutos é gerada pelas indústrias processadoras de pescado e frango. Anualmente a oferta de subprodutos de origem animal no Brasil equivale a 8,8 milhões de toneladas (SINCOBESP, 2010). Ossos, espinhas, cabeças e vísceras são comumente usados para produção de ração animal ou então descartados, devido ao seu baixo valor comercial. Contudo, o trato inadequado dos resíduos industriais contribui para o agravamento dos problemas ambientais. Dessa forma, uma alternativa de aproveitamento desses resíduos consiste no desenvolvimento de novos produtos com maior valor agregado. Ossos de pescado e de frango são importantes fontes minerais e protéicas e uma das formas para aproveitá-las consiste na recuperação das proteínas através da hidrólise enzimática, amplamente aplicada para melhorar e valorizar propriedades funcionais e nutricionais.

Por outro lado, a oxidação lipídica é motivo de grande preocupação para a indústria de alimentos e consumidores, pois leva ao desenvolvimento de sabores e odores indesejáveis e produtos da reação potencialmente tóxicos (Lin e Liang, 2002). Além disso, a produção de radicais livres provenientes da oxidação pode estar associada com o aparecimento de muitas doenças como câncer, doenças neurodegenerativas e coronarianas (Halliwell e Gutteridge, 1984; Diaz et al., 1997). Vários antioxidantes sintéticos, como o butil-hidroxianisol (BHA), butil-hidroxitolueno (BHT), terc-butihidroquinona (TBHQ) e propil galato (PG) são usados como aditivos para prevenir a peroxidação lipídica em muitas áreas, especialmente em alimentos (Wanita e Lorenz, 1996). No entanto, o uso desses compostos químicos antioxidantes é restrito, devido aos riscos potenciais à saúde (Park et al., 2001). Então, a busca por antioxidantes naturais como alternativa aos sintéticos é de grande interesse entre os pesquisadores. A atividade antioxidante de proteínas e peptídeos pode ser resultado do sequestro específico de radicais, formados durante a peroxidação, do sequestro de compostos contendo oxigênio, ou da capacidade quelante dos metais (Kristinsson e Rasco, 2000a).

Vários estudos têm descrito a atividade antioxidante de hidrolisados protéicos de origem animal, como a gema de ovo (Park et al., 2001), espinhas de solha áspera (*Limanda áspera*) (Jun et al., 2004), extratos de frango (Wu et al., 2005), colágeno de porco (Li et al., 2007), resíduos de camarão (Guerard et al., 2007), crista de frango (Rosa et al., 2008), fígado de atum (Je et al., 2009), caseína (Rossini et al., 2009), resíduo de sardinha (Bougatef et al., 2010) ou então pele de atum, lula e linguado (Alemán et al., 2011). O objetivo desse estudo foi investigar a atividade antioxidante de hidrolisados protéicos enzimáticos provenientes de ossos de pescado e de frango, os quais são geralmente

subutilizados ou descartados durante o processamento.

7.2 MATERIAL E MÉTODOS

7.2.1 Matérias-primas

Ossos de castanha (*Umbrina canosa*), obtidos após o processo de filetagem (contendo 15,1% b.u. de proteína) foram doados pela indústria Pescal S/A, localizada na cidade de Rio Grande, RS, Brasil. Ossos de frango (contendo 18,1% de proteína) separados mecanicamente do músculo foram doados pela Cia. Minuano de Alimentos localizada na cidade de Lajeado, RS, Brasil. Ambas as matérias-primas foram trituradas em um moinho de facas (Thomas Scientific – modelo 4, Wiley Mill, EUA) e armazenadas sob congelamento a -20 °C em sacos de polietileno até o momento do uso.

7.2.2 Remoção de proteínas não-colagenosas e desmineralização

As proteínas não-colagenosas foram removidas dos ossos de acordo com o procedimento descrito por Skierka et al. (2006), com algumas modificações. As amostras de ossos triturados foram misturadas em solução de NaOH 0,1 mol/L (1:2, p/v), homogeneizadas a 600 rpm com agitador eixo-hélice (IKA[®], modelo RW28, Staufen, Alemanha) e mantidas a 4 °C por 24 h. Após a mistura foi centrifugada a 9000 x *g* (Biosystems, modelo MPW-350/350R, Brasil) durante 20 min e o sobrenadante foi descartado. Esse procedimento foi repetido novamente. O material sedimentado foi lavado com água fria, para eliminar o residual de NaOH e as proteínas musculares remanescentes, até a água de lavagem atingir pH neutro.

A amostra desproteïnizada foi desmineralizada com solução de HCl 1,0 mol/L (1:4, p/v). Inicialmente a mistura de ossos e ácido clorídrico foi homogeneizada a 600 rpm com agitador eixo-hélice (IKA[®], modelo RW28, Staufen, Alemanha) por 2 min e mantida por 48 h a 4 °C com mudança da solução após 24 h e então filtrada em tecido de algodão. Os ossos desmineralizados foram armazenados sob congelamento a -20 °C em sacos de polietileno até o momento do uso.

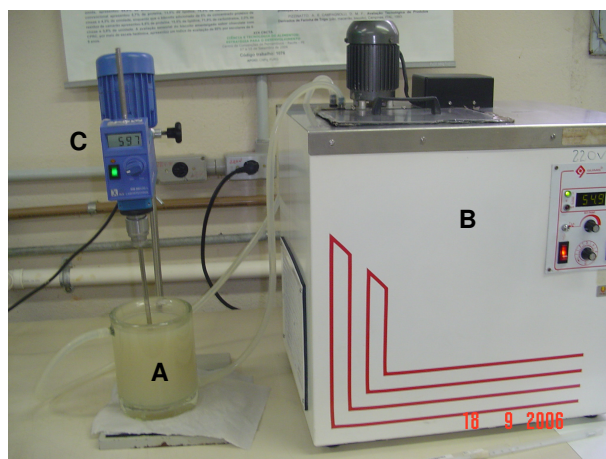
7.2.3 Reagentes e Enzimas

A enzima Flavourzyme 1000L[®] (mistura de endoprotease e exopeptidase de *Aspergillus oryzae*) foi doada pela Novozymes Latin America (Araucária, Brasil). As

enzimas Tripsina e α -Quimotripsina (endopeptidases obtidas do pâncreas bovino) foram fornecidas pela Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA). Todos os demais reagentes e solventes utilizados foram de grau analítico (p.a.).

7.2.4 Preparação dos hidrolisados protéicos

Os ossos de peixe e de frango desmineralizados foram homogeneizados em agitador (IKA®, modelo RW28, Staufen, Alemanha), com solução tampão fosfato 0,2 mol/L, na proporção de 1:3 (p/v), considerando o conteúdo protéico. Antes do início da reação, as misturas foram pré-incubadas em reator de vidro encamisado (Figura 1) por 20 min, nas condições ótimas para cada enzima (50 °C e pH 7,0 para Flavourzyme e 37 °C e pH 8,0 para Tripsina e α -Quimotripsina). A reação de hidrólise iniciou com a adição de enzima na quantidade de 1% (p/p) com agitação de 600 rpm durante 8 h. Tomaram-se amostras em tempos preestabelecidos (zero, 15, 30, 60, 120, 240, 480 min) para medir o grau de hidrólise (GH) conforme o método do ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) descrito por Alder-Nissen (1979) pela determinação da porcentagem de ligações peptídicas hidrolisadas através da medida do número de grupamentos amino livres no sobrenadante, pela reação com TNBS. Foi preparada uma curva padrão de leucina na concentração de 0 a 1,6 mmol/L. Após o fim da reação, a enzima foi inativada termicamente a 85 °C por 15 min com agitação ocasional. Os hidrolisados foram centrifugados a 3500 x g (Biosystems, modelo MPW-350/350R, Brasil) durante 20 min para remover resíduos não hidrolisados.



(A) reator de vidro encamisado
(B) banho ultratermostático
(C) agitador eixo-élice

Figura 1. Sistema utilizado para as reações de hidrólise enzimática dos ossos de peixe e frango.

Finalmente o sobrenadante obtido foi liofilizado (liofilizador MicroModulyo, Edwards, Sussex, UK) e depois armazenado em frascos selados a -20 °C até sua utilização. Foram produzidos seis hidrolisados denominados: hidrolisado de ossos de peixe com

Flavourzyme (PF), hidrolisado de ossos de pescado com α -Quimotripsina (PQ), hidrolisado de ossos de pescado com Tripsina (PT), hidrolisado de ossos de frango com Flavourzyme (FF), hidrolisado de ossos de frango com α -Quimotripsina (FQ) e hidrolisado de ossos de frango com Tripsina (FT).

7.2.5 Determinação da distribuição do peso molecular

A distribuição do peso molecular dos hidrolisados protéicos foi estimada por cromatografia de filtração em gel em um cromatógrafo líquido de rápido desempenho (FPLC ÄKTA - Amersham Biosciences, Suécia) equipado com uma coluna Superdex peptide 10/300 GL, com 30% de acetonitrila e ácido trifluoracético 0,1% como eluente. O volume de exclusão da coluna foi estimado com blue dextran 2000. O fluxo utilizado foi de 0,5 mL/min e as leituras foram realizadas a 280nm. Para determinação quantitativa dos pesos moleculares foram integradas as áreas dos picos dos cromatogramas. Foi preparada uma curva de calibração com ribonuclease A (13700 Da), aprotinina (6500 Da), angiotensina I (1296 Da) e triptofano (204 Da) (Pires et al., 2008).

7.2.6 Determinação de cor

A cor dos hidrolisados liofilizados foi medida com um colorímetro (Macbeth, modelo Color-Eye® 3000, New Windsor, EUA). Antes de iniciar a medição, o equipamento foi calibrado e as amostras foram avaliadas através dos parâmetros luminosidade L^* (branco, + ou preto, -) e cromaticidade a^* (verde, - ou vermelho, +) e b^* (azul, - ou amarelo, +). Para uma melhor avaliação da cor, as três coordenadas mencionados foram combinadas de modo a obter os valores do índice de brancura (IB) calculada pela equação 1, conforme Fujii et al. (1973).

$$IB = 100 - [(100 - L^*)^2 + a^{*2} + b^{*2}]^{1/2} \quad (1)$$

7.2.7 Determinação da atividade antioxidante

7.2.7.1 Inibição da peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi determinada *in vitro* a partir da habilidade dos hidrolisados em inibir a oxidação de uma emulsão que contém ácido linoléico, conforme citado por Osawa e Namiki (1985). Amostras de hidrolisado (5,0 mg) ou padrão α -tocoferol foram dissolvidas em 10 mL de tampão fosfato pH 7,0 (50 mmol/L), adicionou-se 0,13 mL de ácido linoléico e 10 mL de etanol 99,5% em tubos de vidro com tampa de rosca. A mistura foi

homogeneizada e o volume final foi ajustado para 25 mL com água deionizada. Foi preparada uma reação controle usando o mesmo procedimento, com substituição da amostra por tampão fosfato pH 7,0 (50 mmol/L). O conteúdo dos tubos foi incubado a 40 °C no escuro e o grau de oxidação do ácido linoléico foi medido de acordo com Mitsuda et al. (1966), em intervalos de 24 h durante 7 dias. Alíquotas de 100 µL da solução incubada foram misturadas com 4,7 mL de etanol 75% seguido da adição de 100 µL de tiocianato de amônio 30% e 100 µL de solução de cloreto ferroso 0,02 mol/L em HCl 3,5%. Após 3 min, o grau de desenvolvimento de cor, que representa a oxidação do ácido linoléico, foi medido a 500 nm em espectrofotômetro (Biospectro UV, modelo SP-22, Brasil). A inibição da peroxidação apresentada pelos hidrolisados foi calculada conforme a equação 2, onde: Abs = absorbância.

$$\text{Inibição (\%)} = [1 - (\text{Abs}_{\text{amostra}} / \text{Abs}_{\text{controle}})] \times 100 \quad (2)$$

7.2.7.2 Capacidade de sequestro do radical hidroxila

A capacidade dos hidrolisados de inibir radicais hidroxila formados pela reação de Fenton, mediante degradação da 2-desoxi-D-ribose foi determinado conforme Chung et al. (1997). Uma mistura contendo 0,2 mL de FeSO₄.7H₂O 10 mmol/L, 0,2 mL de EDTA 10 mmol/L, 0,2 mL de 2-desoxi-D-ribose 10 mmol/L, 0,2 mL de amostra (1 mg/mL) e 1 mL de solução tampão fosfato (0,2 mol/L, pH 7,4) foi homogeneizada com 0,2 mL de H₂O₂ 10 mmol/L e incubada a 37 °C por 4 h. Em seguida, 1 mL de TCA 2,8% e 1 mL de TBA 1% foram adicionados aos tubos. As amostras foram fervidas em banho-maria a 100 °C, durante 10 min e resfriadas por imersão em um banho de água e gelo por 5 min. A absorbância foi lida a 532 nm em espectrofotômetro UV/VIS (ATI UNICAM Helios, modelo Alfa, UK). O percentual de inibição foi calculado pela equação 3, onde: Abs = absorbância.

$$\text{Inibição (\%)} = [(\text{Abs}_{\text{controle}} - \text{Abs}_{\text{amostra}}) / \text{Abs}_{\text{controle}}] \times 100 \quad (3)$$

7.2.7.3 Capacidade de sequestro do radical livre DPPH

O efeito sequestrador do radical livre 2,2-difenil-1-picril hidrazil (DPPH) foi medido conforme descrito por Shimada et al. (1992), com modificações. Amostras de 1,0 mL em diferentes concentrações (0, 5, 1,0, 2,5 e 5,0 mg/mL), foram adicionadas em 1,0 mL de DPPH 0,1 mmol/L em etanol 95%. A mistura foi homogeneizada em vórtex (Phoenix, AP-56, Brasil) e mantida por 30 min a temperatura ambiente. A absorbância resultante da solução foi medida a 517 nm em espectrofotômetro UV/VIS (ATI UNICAM Helios, modelo Alfa, UK).

Menor absorvância representa maior atividade de sequestro do radical DPPH pelos hidrolisados, a qual foi expressa de acordo com a equação 3.

7.2.7.4 Captura do radical livre ABTS

A atividade antioxidante foi determinada conforme Re et al. (1999), com modificações. ABTS, 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) foi dissolvido em água a uma concentração de 7 mmol/L. O cátion radical ($ABTS^+$) foi produzido pela reação da solução estoque de ABTS com persulfato de potássio 2,45 mmol/L (concentração final) deixando a mistura em repouso no escuro a temperatura ambiente por 16 h antes do uso. A solução estoque foi usada por no máximo 3 dias. No momento do uso, a solução de $ABTS^+$ foi diluída com tampão fosfato de sódio pH 7,4 (5 mmol/L) até absorvância de $0,7 \pm 0,02$ a 734 nm. Após a adição de 20 μ L de amostra (5 mg/mL), adicionou-se 2 mL de solução diluída de $ABTS^+$, agitou-se em vórtex (Phoenix, AP-56, Brasil) e incubou-se em banho-maria a 30 °C durante 6 min. Realizou-se a leitura da absorvância a 734nm em espectrofotômetro UV/VIS (Hitachi U-2001, Japão). Como solução padrão, usou-se o antioxidante sintético Trolox (derivado hidrossolúvel do α -tocoferol) nas concentrações de 0 a 1500 μ mol/L em etanol e os resultados foram expressos como capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC) em mmol/g de amostra.

7.2.7.5 Poder Redutor

A capacidade dos hidrolisados em reduzir Fe^{3+} para Fe^{2+} foi medida espectrofotometricamente (Oyaziu, 1988). Um volume de 2 mL de amostra (5 mg/mL) foi adicionado em 2 mL de tampão fosfato 0,2 mol/L (pH 6,6) e 2 mL de ferricianeto de potássio 1%. A seguir, a mistura foi incubada a 50 °C durante 20 min, e após adicionou-se na reação 2 mL de TCA 10%. Uma alíquota (2 mL) foi misturada com 2 mL de água destilada e 0,4 mL de cloreto férrico 0,1% em tubos de ensaio. Após 10 min de reação, a absorvância da solução resultante foi lida a 700 nm em espectrofotômetro UV/VIS (ATI UNICAM Helios, modelo Alfa, UK). O aumento da absorvância da reação indica aumento do poder redutor.

7.2.8 Análise Estatística

Todas as determinações foram realizadas em triplicata. Os dados para os diferentes parâmetros foram comparados através de análise de variância (ANOVA) com o auxílio do programa STATISTICA[®] versão 6.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, EUA). As diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os resultados foram identificadas usando teste de Tukey.

7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.3.1 Hidrólise enzimática dos ossos de pescado e de frango

No presente estudo, ossos de pescado e de frango foram hidrolisados separadamente pelas enzimas Flavourzyme, α -Quimotripsina e Tripsina, para produção de peptídeos antioxidantes. A extensão da degradação das proteínas pelas enzimas proteolíticas foi medida pela avaliação do grau de hidrólise. O grau de hidrólise (GH) é o indicador mais utilizado para a comparação entre diferentes hidrolisados protéicos (Bougatef et al., 2010). Foram observados valores de GH de 9,7, 8,5 e 6,5 % para os hidrolisados de ossos de pescado com Flavourzyme, α -Quimotripsina e Tripsina, respectivamente e 13,1, 13,0 e 5,6% para os hidrolisados de ossos de frango com Flavourzyme, α -Quimotripsina e Tripsina, respectivamente (Figura 2).

Os valores de GH para PF e PQ foram significativamente iguais ($p>0,05$), assim como FF e FQ, indicando que a hidrólise enzimática com Flavourzyme e α -Quimotripsina resultou em aumento de proteína solúvel após 8 h com possível liberação de aminoácidos livres. Os hidrolisados produzidos com a enzima Tripsina apresentaram valores menores de GH em relação aos demais. Conforme relatado por Hinsberger e Sandhu (2004), isso pode ser devido à seletividade da enzima, a qual catalisa apenas a hidrólise das ligações peptídicas em que o grupo carbonila (-CO-) é fornecido pelos aminoácidos básicos arginina ou lisina.

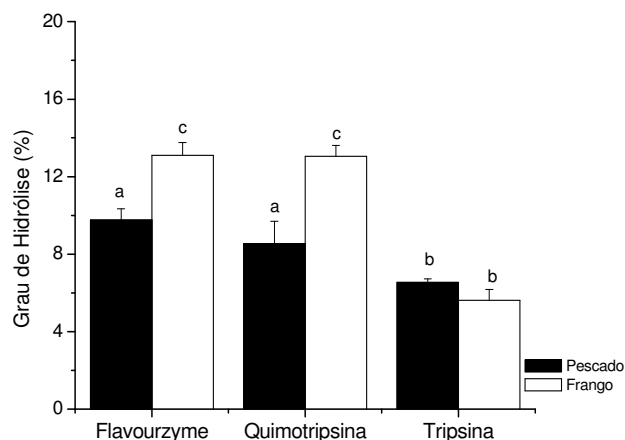


Figura 2. Grau de hidrólise dos hidrolisados de ossos de pescado e de frango tratados com diferentes enzimas após 8 h de reação. Valores representam a média \pm desvio padrão. Letras iguais, não há diferenças significativas ($p>0,05$).

7.3.2 Cor

Na Tabela 1 estão apresentados os parâmetros de cor para os hidrolisados enzimáticos. A cor é um atributo de grande importância na comercialização de alimentos, considerado o primeiro critério de aceitação ou rejeição de um produto. Em geral, os hidrolisados de ossos de pescado apresentaram cor creme, levemente mais escurecida que os hidrolisados de ossos de frango, os quais foram brancos. Observou-se que PF e FF foram iguais ($p > 0,05$) em L^* e os hidrolisados PQ, PT, FF e FQ foram similares em relação ao parâmetro a^* . FF apresentou o menor valor de b^* (4,5) enquanto que PT foi o mais amarelado com valor de b^* de 7,4. De acordo com Zelechowska et al. (2010), a cor mais escura nos hidrolisados protéicos de pescado pode ser devido à presença de proteína muscular residual que não foi removida completamente, mesmo após os tratamentos de desproteinização e desmineralização.

Além disso, as características de cada matéria-prima também podem contribuir para essa diferença, visto que provêm de duas espécies animais diferentes. Os hidrolisados mostraram diferenças significativas ($p < 0,05$) nos valores de IB, porém não houve uma relação clara entre as matérias-primas e as diferentes enzimas utilizadas.

Tabela 1. Parâmetros de cor apresentados pelos hidrolisados protéicos de ossos de pescado e de frango.

Amostras	L^*	a^*	b^*	(IB)
PF	$90,6 \pm 0,14^{a,b}$	$-0,0445 \pm 0,02^a$	$6,8 \pm 0,05^a$	$88,4 \pm 0,08^a$
PQ	$92,4 \pm 0,49^c$	$-0,3705 \pm 0,08^{b,d}$	$4,9 \pm 0,003^b$	$90,9 \pm 0,41^b$
PT	$90,4 \pm 0,28^a$	$-0,2135 \pm 0,08^{a,d}$	$7,4 \pm 0,04^c$	$87,9 \pm 0,20^a$
FF	$91,1 \pm 0,01^b$	$-0,5030 \pm 0,02^{c,d}$	$4,5 \pm 0,001^d$	$90,0 \pm 0,01^c$
FQ	$91,2 \pm 0,15^b$	$-0,5275 \pm 0,01^{c,d}$	$5,9 \pm 0,10^e$	$89,3 \pm 0,07^d$
FT	$90,4 \pm 0,11^a$	$-0,3695 \pm 0,11^d$	$5,8 \pm 0,21^e$	$88,8 \pm 0,20^{a,d}$

Valores correspondentes à média de três repetições \pm desvio padrão. Valores médios com letras diferentes em cada coluna diferem significativamente ($p < 0,05$). PF = hidrolisado de ossos de pescado com Flavourzyme; PQ = hidrolisado de ossos de pescado com α -Quimotripsina; PT = hidrolisado de ossos de pescado com Tripsina; FF = hidrolisado de ossos de frango com Flavourzyme; FQ = hidrolisado de ossos de frango com α -Quimotripsina; FT = hidrolisado de ossos de frango com Tripsina.

7.3.3 Atividade Antioxidante dos hidrolisados protéicos de pescado e frango

Hidrolisados protéicos produzidos usando diferentes enzimas apresentam peptídeos de diferentes tamanhos e seqüências de aminoácidos que podem determinar a sua

capacidade antioxidante. Os ensaios radicais utilizados para avaliação do poder antioxidante podem influenciar os resultados experimentais. Assim, duas ou mais avaliações distintas são requeridas para investigar a capacidade sequestrante de um determinado antioxidante (Yu et al., 2002). Os hidrolisados de ossos de castanha e de frango foram liofilizados e tiveram sua atividade antioxidante avaliada usando diferentes ensaios incluindo, inibição da peroxidação do ácido linoléico, capacidade de sequestro do radical hidroxila (OH^*), capacidade de sequestro do radical livre DPPH, capacidade de sequestro do radical livre ABTS e poder redutor.

7.3.3.1 Inibição da peroxidação lipídica

Os hidrolisados contendo uma mistura de peptídeos foram avaliados utilizando o ensaio de inibição da peroxidação lipídica em sistema modelo com ácido linoléico em emulsão, como descrito anteriormente. Como observado na Figura 3, todos os hidrolisados atuam como retardadores da peroxidação lipídica visto que apresentaram capacidade de inibir a oxidação, no entanto, a atividade antioxidante desses produtos foi menor que do α -tocoferol. Menores valores de absorvância representam maior inibição da peroxidação lipídica. O controle (sem antioxidante) mostrou os maiores valores de absorvância indicando o maior grau de oxidação entre as amostras analisadas. Entre os hidrolisados de ossos de pescado, o hidrolisado obtido com a enzima Flavourzyme (PF) exerceu a maior inibição (77,3%) ao final de 7 dias de avaliação, semelhante ao antioxidante natural α -tocoferol (77,6%). Entre os hidrolisados de ossos de frango, o hidrolisado obtido com a enzima Flavourzyme (FF) apresentou maior poder de inibição (61,6%), indicando que esse hidrolisado possivelmente contém peptídeos antioxidantes. Além disso, verificou-se que a capacidade dos hidrolisados inibirem a oxidação lipídica foi influenciada pelo GH.

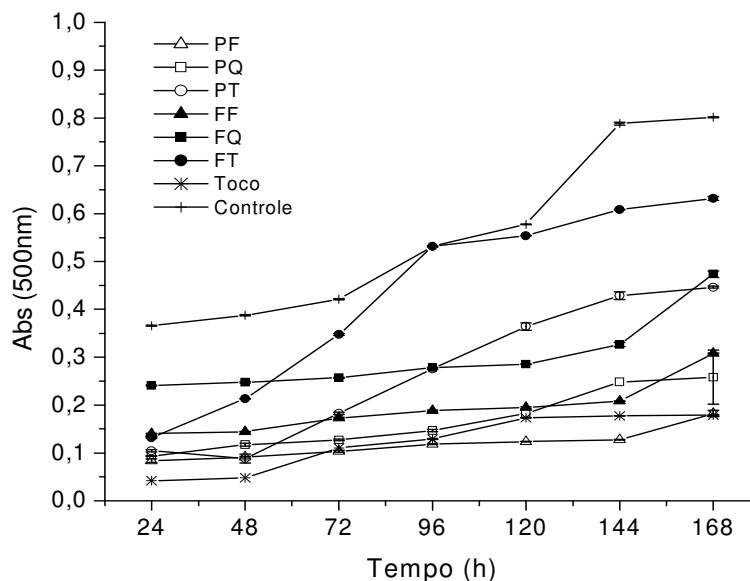


Figura 3. Atividade antioxidante dos hidrolisados enzimáticos de peixe e frango medida pela inibição da peroxidação lipídica. Valores correspondentes à média de três repetições \pm desvio padrão. Toco = α -Tocoferol; PF = hidrolisado de ossos de peixe com Flavourzyme; PQ = hidrolisado de ossos de peixe com α -Quimotripsina, PT = hidrolisado de ossos de peixe com Tripsina; FF = hidrolisado de ossos de frango com Flavourzyme; FQ = hidrolisado de ossos de frango com α -Quimotripsina; FT = hidrolisado de ossos de frango com Tripsina.

Também foi verificado que os hidrolisados protéicos produzidos com a enzima Flavourzyme apresentaram melhor desempenho na inibição da peroxidação lipídica que enzimas específicas como a α -Quimotripsina e a Tripsina. Hidrolisados que mostraram maiores valores de GH (PF, PQ, FF) exibiram atividade antioxidante mais pronunciada, possivelmente devido a fatores como tamanho e composição dos peptídeos, os quais desempenham um papel importante na capacidade de retardar ou inibir a oxidação. O hidrolisado de ossos de frango obtido com a enzima Tripsina (FT) se destacou significativamente dos restantes, apresentando o menor poder antioxidante. Conforme Pihlanto (2006), isso pode ser devido à possibilidade do hidrolisado conter ambos componentes antioxidativos e pró-oxidativos, formando um sistema antioxidante menos eficiente contra a oxidação lipídica.

7.3.3.2 Capacidade de sequestro do radical hidroxila

O radical hidroxila é uma das espécies reativas de oxigênio, geradas no corpo humano, que apresenta elevada reatividade química e a sua remoção pode proteger o organismo de várias doenças (Je et al., 2005a; Je et al., 2009). Além de ser um poderoso

oxidante, principalmente de lipídios, este pode reagir facilmente com aminoácidos, proteínas, DNA e componentes da membrana, causando significativos danos fisiológicos (Batista et al., 2010). Na Figura 4, os resultados obtidos indicaram que os hidrolisados protéicos com maior GH, ou seja, aqueles preparados com a enzima Flavourzyme, mostraram atividade sequestradora do radical hidroxila significativamente maior ($p < 0,05$) do que os obtidos com as enzimas α -Quimotripsina e Tripsina, porém FF não diferiu significativamente de FQ.

O poder de inibição do radical hidroxila foi de 28,1 e 12,8%, para PF e FF, respectivamente, valores estes relativamente menores quando comparados com a atividade de sequestro do radical hidroxila de hidrolisados protéicos provenientes de carpa prateada (Dong et al., 2008). PF se destacou dos demais hidrolisados, pois se observa claramente seu maior poder sequestrador. Essa diferença pode ser atribuída à presença de aminoácidos e peptídeos específicos e à sua composição (Wu et al., 2003).

Utilizando a enzima Flavourzyme foram produzidos hidrolisados a partir de ossos de pescado com maior poder sequestrante em relação aos hidrolisados de ossos de frango. Observando os hidrolisados produzidos com a enzima α -Quimotripsina, verificou-se que maior efeito seqüestrador foi alcançado com os hidrolisados de ossos de frango. A enzima Tripsina mostrou o mesmo efeito sobre as duas espécies estudadas.

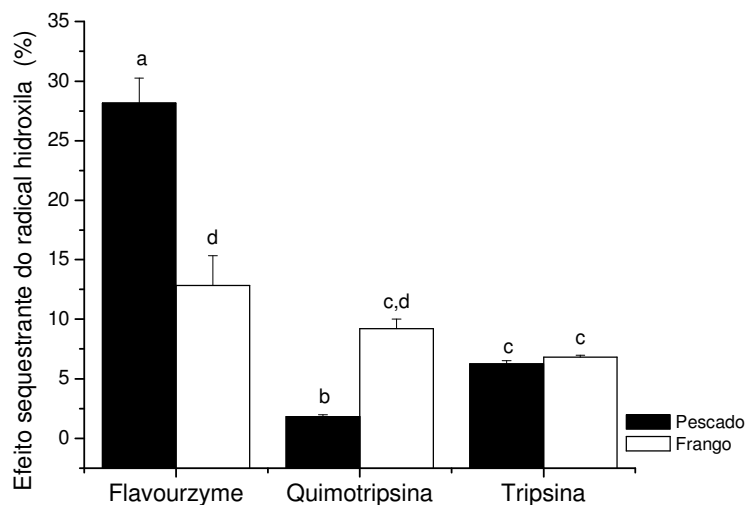


Figura 4. Atividade sequestradora do radical hidroxila. Valores correspondentes à média de três repetições \pm desvio padrão. Letras iguais, não há diferenças significativas ($p > 0,05$).

7.3.3.3 Capacidade de sequestro do radical livre DPPH

DPPH é um radical livre estável que apresenta máxima absorvância a 517 nm.

Quando o DPPH encontra um doador de prótons (H^+) como, por exemplo, um antioxidante, o radical é eliminado e a absorbância é reduzida, o que pode ser evidenciado pela mudança na coloração violeta para amarelo (Shimada et al., 1992). Baseado nesse princípio, a atividade antioxidante de uma substância pode ser expressa como a sua habilidade de sequestrar o radical DPPH. A Figura 5 mostra os resultados da capacidade dos hidrolisados de ossos de peixe e de frango sequestrar o radical DPPH, empregando diferentes concentrações.

Observou-se que o efeito sequestrador aumentou com o incremento da concentração de hidrolisado, ou seja, os resultados mostram uma atividade dose-dependente. Os hidrolisados com os maiores valores de GH, produzidos com a enzima Flavourzyme exibiram maior atividade de sequestro do radical DPPH (23,3 e 21,3% para PF e FF respectivamente), empregando uma concentração de 5 mg/mL. Isso indica que o GH pode influenciar grandemente as propriedades antioxidantes dos peptídeos (Li et al., 2007). Resultados semelhantes foram relatados para proteína de bijupirá (Yang et al., 2008) e ossos de atum (Je et al., 2007). Em concentrações abaixo de 2,5 mg/mL, nenhum hidrolisado apresentou atividade de sequestro do radical DPPH acima de 20%, um valor relativamente menor comparado com hidrolisados protéicos de fígado de atum produzidos por Je et al. (2009).

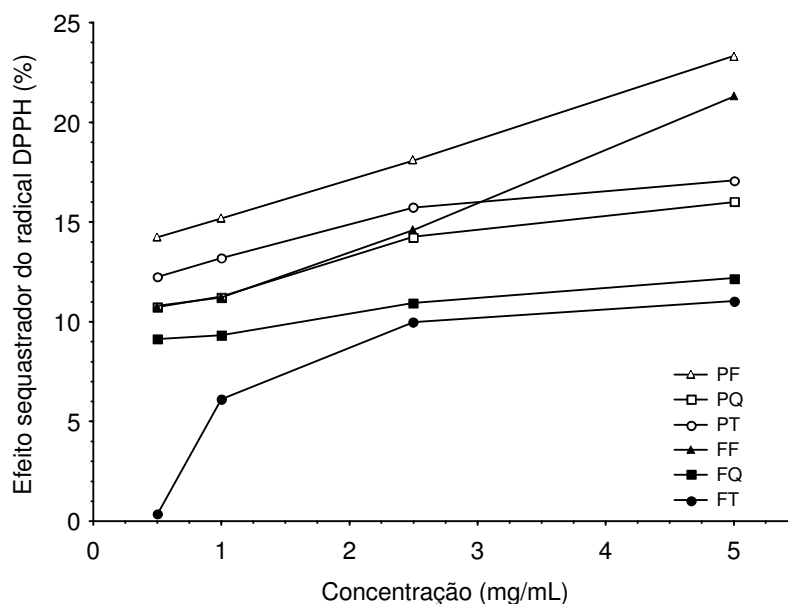


Figura 5. Atividade de sequestro do radical DPPH. Valores correspondentes à média de três repetições (desvio padrão $\leq 1\%$). PF = hidrolisado de ossos de peixe com Flavourzyme; PQ = hidrolisado de ossos de peixe com α -Quimotripsina, PT = hidrolisado de ossos de peixe com Tripsina; FF = hidrolisado de ossos de frango com Flavourzyme; FQ = hidrolisado de ossos de frango com α -Quimotripsina; FT = hidrolisado de ossos de frango com Tripsina.

A enzima Flavourzyme apresenta novamente um efeito eficaz na produção de peptídeos com atividade de sequestro do radical DPPH, maior que as enzimas α -Quimotripsina e Tripsina.

7.3.3.4 Capacidade de sequestro do radical livre ABTS

Um dos métodos utilizados para medir a atividade antioxidante é através da captura do radical 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), que pode ser gerado através de uma reação química, eletroquímica ou enzimática (Kuskoski et al., 2005). O $ABTS^+$ é um radical relativamente estável e facilmente reduzido por um antioxidante (Miller et al., 1993). Através da redução da cor do radical ABTS, hidrolisados protéicos de várias fontes já foram identificados como potenciais antioxidantes (Miliauskas et al., 2004; Rossini et al., 2009). Em nosso trabalho, os peptídeos de ossos de pescado e de frango exibiram atividade sequestradora do radical livre e os resultados estão representados pela Figura 6.

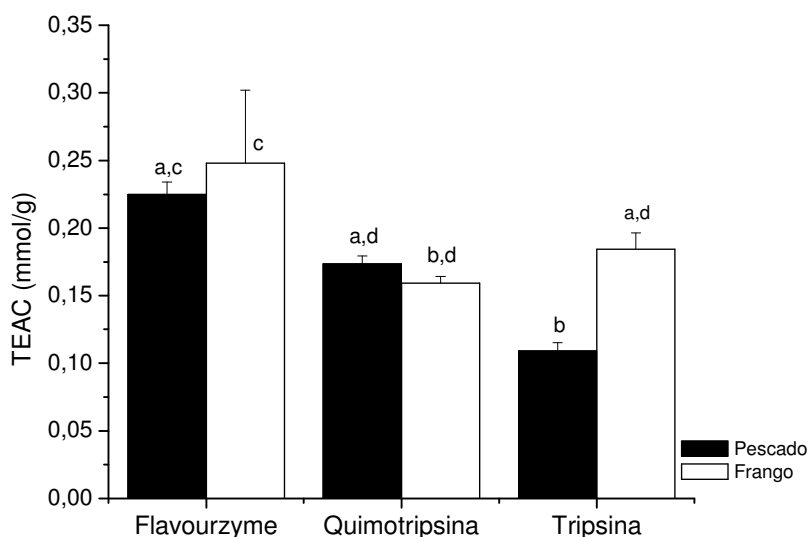


Figura 6. Inibição do radical livre ABTS. Valores correspondentes à média de três repetições \pm desvio padrão. Letras iguais, não há diferenças significativas ($p > 0,05$).

A Figura 6 indica que os peptídeos ou aminoácidos livres nos hidrolisados possuem capacidade de doar o átomo de hidrogênio aos radicais livres, retardando o processo de propagação (Faithong et al., 2010). Os valores de TEAC variaram de 0,109 a 0,248 mmol/g e os maiores potenciais foram encontrados para os hidrolisados obtidos com a enzima Flavourzyme (0,248 e 0,225 mmol/g, para FF e PF respectivamente), no entanto o PF não diferiu significativamente ($p > 0,05$) de PQ e FT. Valores semelhantes foram relatados por Faithong et al. (2010) em pasta fermentada de camarão. Esse resultado indica que os

peptídeos produzidos podem ser diferentes em termos de composição de aminoácidos, seqüência e comprimento da cadeia (Khantaphant e Benjakul, 2008). Comparando os resultados obtidos para os hidrolisados produzidos com a enzima Flavourzyme (PF e FF), utilizando concentrações de 1 mg/mL, evidencia-se que a atividade de sequestro do radical hidroxila foi mais efetiva que o DPPH, no entanto, quando se compara os resultados de atividade antiradicalar entre ABTS e DPPH, os hidrolisados PF e FF apresentaram maior capacidade de inibir o radical ABTS, utilizando concentrações de 5 mg/mL, sugerindo que os hidrolisados podem sequestrar os radicais hidroxila, DPPH e ABTS diferentemente.

7.3.3.5 Poder Redutor

O poder redutor é uma medida que fornece uma estimativa da capacidade de um composto reduzir Fe^{3+} (na forma de ferricianeto) para Fe^{2+} (forma ferrosa) na presença de um composto antioxidante através da mudança da cor amarela da solução para tons de verde e azul, formando o composto azul da Prússia (Ferreira et al., 2007).

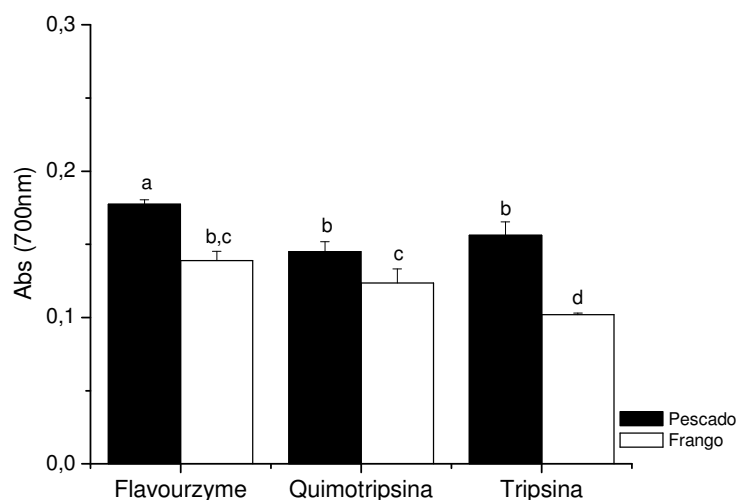


Figura 7. Poder redutor dos hidrolisados de pescado e frango. Valores correspondem a média de 3 repetições. Letras iguais, não há diferenças significativas ($p > 0,05$).

Os hidrolisados produzidos a partir de ossos de pescado apresentaram em geral, maior poder redutor em relação aos hidrolisados de ossos de frango (Figura 7). O poder redutor mais elevado foi observado para PF, o qual mostrou o maior GH entre os hidrolisados de pescado, seguido por PT e PQ. Entre os hidrolisados de frango, o maior poder redutor foi observado para FF, que também apresentou o maior GH. No entanto, os resultados de FF, PQ e PT não diferiram significativamente ($p > 0,05$). De acordo com Je et al. (2009), o poder redutor mais elevado pode ser atribuído ao maior conteúdo de peptídeos

doadores de elétrons ou hidrogênio. Os valores de absorvância não foram superiores a 0,2 utilizando concentração de 5 mg/mL. Valores semelhantes foram relatados por Wu et al. (2005) para extratos de essência de frango.

7.3.4 Distribuição do peso molecular dos hidrolisados

A distribuição de peso molecular dos hidrolisados foi analisada por cromatografia de filtração em gel (Tabela 5). FQ teve a maior porcentagem ($74,5\% \pm 2,4$) de peptídeos de peso molecular <3 kDa e <1 kDa. As porcentagens das frações com peso molecular entre 3-6 e >6 kDa foram menores. A Tabela 2 mostra que todos os hidrolisados de frango apresentaram como principal componente a fração peptídica de peso molecular <3 kDa. Considerando a área do pico da fração <1 kDa (contida na fração <3 kDa), a ordem, com base na porcentagem de área, para frango foi: FQ ($74,5\%$) $>$ FF ($72,0\%$) $>$ FT ($65,6\%$), e para pescado: PQ ($53,5\%$) $>$ PF ($48,7\%$) $>$ PT ($47,6\%$). Observou-se ainda que, as proteases mais eficazes para hidrolisar proteínas de colágeno de pescado e frango foram α -Quimotripsina e Flavourzyme, seguidas pela Tripsina.

Tabela 2. Distribuição de peso molecular dos hidrolisados protéicos de ossos de pescado e de frango.

Peso molecular estimado (kDa)	Área do pico (%)*					
	PF	PQ	PT	FF	FQ	FT
>6	$0,49 \pm 0,04$	$3,9 \pm 0,2$	$2,2 \pm 0,37$	$10,5 \pm 0,9$	$1,1 \pm 0,1$	$3,8 \pm 0,1$
3-6	$50,8 \pm 0,4$	$38,4 \pm 1,9$	$49,9 \pm 0,9$	$17,4 \pm 2,6$	$24,4 \pm 1,0$	$30,6 \pm 4,3$
<3	$48,7 \pm 1,3$	$57,7 \pm 6,6$	$47,8 \pm 2,3$	$72,0 \pm 4,0$	$74,5 \pm 2,4$	$65,6 \pm 4,4$
<1	$48,7 \pm 1,3$	$53,5 \pm 6,5$	$47,6 \pm 2,7$	$72,0 \pm 4,0$	$74,5 \pm 2,4$	$65,6 \pm 4,4$

*Valores correspondentes a média de 3 repetições \pm desvio padrão. PF = hidrolisado de ossos de pescado com Flavourzyme; PQ = hidrolisado de ossos de pescado com α -Quimotripsina, PT = hidrolisado de ossos de pescado com Tripsina; FF = hidrolisado de ossos de frango com Flavourzyme; FQ = hidrolisado de ossos de frango com α -Quimotripsina; FT = hidrolisado de ossos de frango com Tripsina.

7.4 CONCLUSÃO

Foi possível mostrar que a atividade antioxidante dos peptídeos dos hidrolisados de ossos de pescado e de frango difere segundo o tipo de enzima utilizada, o grau de hidrólise e o tipo de sistema em que os antioxidantes são testados. Os hidrolisados de ossos de

pescado e de frango apresentaram diferença na distribuição do peso molecular resultando em diferentes comportamentos de atividade antioxidantes. Os hidrolisados de ossos de pescado e frango obtidos com a enzima Flavourzyme apresentaram elevada atividade de inibição da peroxidação lipídica podendo atuar efetivamente como antioxidantes. A enzima Flavourzyme foi mais eficaz na produção de hidrolisados antioxidantes que α -Quimotripsina e Tripsina, no entanto, a maior proporção de peptídeos de baixo peso molecular, para ossos de pescado e frango, foi observada nos hidrolisados com α -Quimotripsina. O GH não se mostrou inteiramente relacionado com a distribuição de peso molecular dos hidrolisados indicando que outros fatores podem estar envolvidos, como, por exemplo, a composição de aminoácidos.

7.5 AGRADECIMENTOS

Esse trabalho foi financiado pela CAPES e CNPq (Concessão 305055/2006-2), e pela Comunidade Européia, através do Projeto Chill-On (FP 6- 409 016333-2).

7.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER-NISSEN J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 27, 1256-1262, 1979.

ALEMÁN, A.; GIMÉNEZ, B.; MONTERO, P.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. Antioxidant activity of several marine skin gelatins. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, p. 407-413, 2011.

BATISTA, I.; RAMOS, C.; COUTINHO, J.; BANDARRA, N. M.; NUNES, M. L. Characterization of protein hydrolysates and lipids obtained from black scabbardfish (*Aphanopus carbo*) by-products and antioxidative activity of the hydrolysates produced. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 18-24, 2010.

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

CHUNG, S. K.; OSAWA, T.; KAWAKISHI, S. Hydroxyl radical scavenging effect of spices

and scavengers from Brown Mustard (*Brassica nigra*). **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 61, p. 118-124, 1997.

DIAZ, M. N.; FREI, B.; VITA, J. A.; KEANEY, J. F. Antioxidants andtherosclerotic heart disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 337, p. 408-416, 1997.

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

FAITHONG, N.; BENJAKUL, S.; PHATCHARAT, S. BINSAN, W.; Chemical composition and antioxidative activity of Thai traditional fermented shrimp and krill products. **Food Chemistry**, v. 119, p. 133-140, 2010.

FERREIRA, I. C. F. R.; BAPTISTA, P.; VILAS-BOAS, M.; BARROS, L. Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. **Food Chemistry**, v. 100, p. 1511-1516, 2007.

FUJII, Y.; WATANABE, K.; MARUYAMA, Y. Relation between the ATP-breakdown in ice-stored Alaska Pollack meat and the quality of frozen surimi. **Bulletin of Tokai Regional Fisheries Research Laboratory**, v. 75, p. 7-11, 1973.

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

HALLIWELL, B.; GUTTERIDAGE, J. M. C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. **Biochemistry Journal**, v. 219, p. 1-4, 1984.

HINSBERGER, A.; SANDHU, B. K. Digestion and absorption. **Current Paediatric**, v. 14, p. 605-611, 2004.

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

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

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

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

KHANTAPHANT, S.; BENJAKUL, S. Comparative study on the proteases from fish pyloric caeca and the use for production of gelatin hydrolysate with antioxidative activity. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, v. 151, p. 410-419, 2008.

KRISTINSSON, H. G.; RASCO, B. A. Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical and Functional Properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 40, n.1, p. 43-81, 2000a.

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

LI, B.; CHEN, F.; WANG, X.; JI, B.; WU, Y. Isolation and identification of antioxidative peptides from porcine collagen hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 102, p. 1135-1143, 2007.

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.

MILLER, N. J.; RICE-EVANS, C.; DAVIES, M. J.; GOPINATHAN, V.; MILNER, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. **Clinical Science**, v. 84, p. 407-412, 1993.

MILIAUSKAS, G.; VENSKUTONIS, P.; van BEEK, T. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. **Food Chemistry**, v. 85, p. 231-237, 2004.

MITSUTA, H.; YASUMOTO, K.; IWAMI, K. Antioxidative action of indole compounds during the autoxidation of linoleic acid. **Eiyo to Shokuryo**, v. 19, p. 210–214, 1966.

OSAWA, T.; NAMIKI, M. Natural antioxidants isolated from eucalyptus leaf waxes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 33, p. 777-780, 1985.

OYAIZU, M. Antioxidative activities of browning products of glucosamine fractionated by organic solvent and thin-layer chromatography. **Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi**, v. 35, p. 771-775, 1988.

PARK, P. J.; JUNG, W. K.; NAM, K. S.; SHAHIDI, F.; KIM, S. K. Purification and characterization of antioxidative peptides from protein hydrolysate of lecithin-free egg yolk. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 78, p. 651-656, 2001.

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

PIRES, C.; BATISTA, I.; GODINHO, V.; NUNES, M. L. Functional and biochemical characterization of proteins remaining in solution after isoelectric precipitation. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 17, n.1, p. 60-72, 2008.

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.

ROSA, C. S.; HOELZEL, S. C.; VIERA, V. B.; BARRETO, P. M.; BEIRÃO, L. H. Atividade antioxidante do ácido hialurônico extraído da crista de frango. **Ciência Rural**, v. 38, n. 9, p. 2593-2598, 2008.

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

SHIMADA, K.; FUJIKAWA, K.; YAHARA, K.; NAKAMURA, T. Antioxidative properties of xanthan on the antioxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 945-948, 1992.

SINCOBESP. **Revista Graxaria Brasileira**. Indústria de Farinha e Gordura Animal. Edição nº 15, ano 3, 66p, 2010. Disponível em: <<http://editorastilo.com.br/portal/pdf/revistas>>. Acesso em: 02 de junho de 2010.

SKIERKA, E.; SADOWSKA, M.; MAJEWSKA, J. Optimization of protein recovery from cod backbone. **Veterinary Medicine**, v. 62, p. 579–582, 2006.

WANITA, A.; LORENZ, K. Antioxidant potential of 5-*N*-pentadecylresorcinol. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 20, p. 417-429, 1996.

WU, H. C.; CHEN, H. M.; SHIAU, C. Y. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). **Food Research International**, v. 36, p. 949-957, 2003.

WU, H. C.; SUN, P. B.; CHANG, C. L.; SHIAU, C. Y. Low-molecular-weight peptides as related to antioxidant properties of chicken essence. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 13, p. 176-183, 2005.

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

YU, L.; HALEY, S.; PERRET, J.; HARRIS, M.; WILSON, J.; QIAN, M. Free radical scavenging properties of wheat extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 1619-1624, 2002.

ZELECHOWSKA, E.; SADOWSKA, M.; TURK, M. Isolation and some properties of collagen from the backbone of Baltic cod (*Gadus morhua*). **Food Hydrocolloids**, v. 24, p. 325-329, 2010.

**8 PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES E BIOQUÍMICAS DE HIDROLISADOS
PROTÉICOS PREPARADOS A PARTIR DE MÚSCULO DE PESCADO E DE FRANGO**

PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES E BIOQUÍMICAS DE HIDROLISADOS PROTÉICOS PREPARADOS A PARTIR DE MÚSCULO DE PESCADO E DE FRANGO

Graciela Salete Centenaro, Myriam Salas-Mellado, Carlos Prentice Hernández

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi investigar a atividade antioxidante de hidrolisados protéicos produzidos com músculo de pescado e frango utilizando diferentes sistemas *in vitro*. Foram determinadas a atividade antioxidante e as propriedades bioquímicas de hidrolisados protéicos de músculo de pescado (*Umbrina canosa*) e de frango (*Gallus domesticus*) usando as enzimas proteolíticas Flavourzyme, α -Quimotripsina e Tripsina. Os hidrolisados protéicos de pescado apresentaram cor amarelada e os hidrolisados de frango cor branca. As atividades antioxidantes foram avaliadas através da inibição da peroxidação do ácido linoléico, do poder redutor, da capacidade de sequestro dos radicais hidroxila (OH^\bullet), do 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) e 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS). Entre os seis hidrolisados, o hidrolisado de músculo de pescado com Flavourzyme (HPF) apresentou maior atividade antioxidante em relação a todos os ensaios testados e, em geral os hidrolisados de pescado foram significativamente ($p < 0,05$) mais potentes na atividade antioxidante que os hidrolisados de frango. A fração com peso molecular < 3 kDa foi a principal constituinte dos seis hidrolisados seguida pela fração < 1 kDa.

Palavras-chave: atividade antioxidante; castanha; frango; hidrólise enzimática; peptídeos

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the antioxidant activity of protein hydrolysates produced with fish and chicken muscle using different *in vitro* systems. Antioxidant activity and biochemical properties of protein hydrolysates from fish (*Umbrina canosai*) and chicken (*Gallus domesticus*) muscle using the proteolytic enzymes Flavourzyme, α -Chymotrypsin and Trypsin were determined. The fish protein hydrolysates had a yellowish color and the chicken hydrolysates a white color. The antioxidant activities were assessed by inhibition of linoleic acid peroxidation, reducing power, hydroxyl radical (OH^\bullet), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) scavenging activities. Among the six hydrolysates, fish meat that was hydrolyzed with Flavourzyme (HPF) had the highest antioxidant activity when compared with all the other tests, and in general the fish hydrolysates were significantly ($p < 0.05$) more potent in antioxidant activity than the chicken hydrolysates. The fraction with molecular weight < 3 kDa was the main constituent of the six hydrolysates followed by fraction < 1 kDa.

Keywords: antioxidant activity; muscle; Argentine croaker; chicken, enzymatic hydrolysis; peptides

8.1 INTRODUÇÃO

Tradicionalmente, as proteínas são consumidas como parte importante da dieta humana, pois são fonte de aminoácidos essenciais necessários para o crescimento e manutenção das funções fisiológicas. Na última década, vem aumentando o interesse em identificar e caracterizar peptídeos bioativos de fontes vegetais e animais. Estes exercem várias funções biológicas, e uma das mais importantes é a atividade antioxidante (Sarmadi e Ismail, 2010). Hidrolisados protéicos de diferentes fontes animais como porco (Saiga et al., 2003), frango (Wu et al., 2005), carpa prateada (Dong et al., 2008), atum (Je et al., 2009), sardinha (Bougatef et al., 2010) e tilápia (Foh et al., 2010), tem sido descritos por apresentarem propriedades antioxidativas.

A oxidação lipídica é motivo de grande preocupação para a indústria de alimentos, pois leva ao desenvolvimento de sabores e odores indesejáveis, alteração da cor, formação de produtos potencialmente tóxicos ocasionando redução do valor nutricional (Erickson, 1992; Lin e Liang, 2002). Devido à tendência atual pela procura cada vez maior de produtos naturais pelos consumidores, causada pela crescente preocupação com a saúde, torna-se necessário o estudo de novas fontes protéicas como antioxidantes naturais, em substituição aos convencionais BHA e BHT amplamente utilizados, porém suspeitos de causar ou provocar efeitos negativos na saúde (Pokorny, 1991).

O entendimento das propriedades antioxidantes de hidrolisados protéicos de origem animal como pescado e frango pode levar à utilização dessas proteínas como potentes antioxidantes naturais. Por outro lado, as características da matéria utilizada na obtenção de hidrolisados, o seu modo de produção e a conseqüente complexidade da sua composição química não permitem estabelecer ainda com exatidão as suas respectivas propriedades antioxidantes (Faria e Batista, 2007).

Considerando que o Brasil ocupou o terceiro lugar na produção mundial de carnes de frango em 2009 (UBABEF, 2009), e que dentre as espécies marinhas, a castanha é intensamente explorada na plataforma continental do sul do país (Haimovici et al., 2006), o objetivo desse trabalho foi investigar a atividade antioxidante de hidrolisados protéicos produzidos com músculo de pescado e frango utilizando diferentes sistemas *in vitro*.

8.2 MATERIAL E MÉTODOS

8.2.1 Matérias-primas

A espécie de pescado utilizada foi castanha (*Umbrina canosa*), doada pela indústria

Pescal S/A, localizada na cidade de Rio Grande, RS, Brasil. Depois de capturado, o pescado foi filetado e o músculo obtido (contendo 18,2% de proteína) foi triturado uniformemente e armazenado sob congelamento a -20 °C em sacos de polietileno até o momento do uso. O músculo de frango congelado (contendo 21,4% de proteína) foi fornecido pela Cia. Minuano de Alimentos localizada na cidade de Lajeado, RS, Brasil, e armazenado sob congelamento a -20 °C em sacos de polietileno até o momento do uso.

8.2.3 Reagentes e Enzimas

A enzima Flavourzyme 1000L[®] (mistura de endoprotease e exopeptidase de *Aspergillus oryzae*) foi doada pela Novozymes Latin America (Araucária, Brasil). As enzimas Tripsina e α -Quimotripsina (endopeptidases obtidas do pâncreas bovino) foram fornecidas pela Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA). Todos os demais reagentes e solventes utilizados nesse estudo foram de grau analítico (p.a.).

8.2.4 Preparação dos hidrolisados protéicos

O músculo foi homogeneizado (agitador eixo-hélice IKA[®], modelo RW28, Staufen, Alemanha), com solução tampão fosfato 0,2 mol/L, na proporção de 1:3 (p/v), antes do início da reação considerando o conteúdo protéico. Antes do início da reação, as misturas foram pré-incubadas em reator de vidro encamisado (Figura 1, pág. 61) por 20 min, nas condições ótimas para cada enzima (50 °C e pH 7,0 para Flavourzyme e 37 °C e pH 8,0 para Tripsina e α -Quimotripsina) por 20 min. A reação de hidrólise iniciou com a adição de enzima na quantidade de 1% (p/p) com agitação a 600 rpm (agitador eixo-hélice, IKA[®], modelo RW28, Staufen, Alemanha), durante 4 h.

Tomaram-se amostras em tempos preestabelecidos (zero, 15, 30, 60, 120, 240 min) para medir o grau de hidrólise (GH) conforme o método do ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) descrito por Alder-Nissen (1979) pela determinação da porcentagem de ligações peptídicas hidrolisadas através da medida do número de grupamentos amino livres no sobrenadante, pela reação com TNBS. Foi preparada uma curva padrão de leucina na concentração de 0 a 1,6 mmol/L.

Após o fim da reação, a enzima foi inativada termicamente a 85 °C por 15 min com agitação ocasional. Os hidrolisados foram centrifugados a 3500 x g (Biosystems, modelo MPW-350/350R, Brasil) durante 20 min para remover resíduos não hidrolisados. Finalmente o sobrenadante obtido foi liofilizado (liofilizador MicroModulyo, Edwards, UK) e armazenado em frascos selados a -20 °C até sua utilização. Foram produzidos seis hidrolisados

denominados: hidrolisado de músculo de peixe com Flavourzyme (HPF), hidrolisado de músculo de peixe com α -Quimotripsina (HPQ), hidrolisado de músculo de peixe com Tripsina (HPT), hidrolisado de músculo de frango com Flavourzyme (HFF), hidrolisado de músculo de frango com α -Quimotripsina (HFQ), hidrolisado de músculo de frango com Tripsina (HFT).

8.2.5 Determinação da distribuição do peso molecular

A distribuição do peso molecular dos hidrolisados protéicos foi estimada por cromatografia de filtração em gel em um cromatógrafo líquido de rápido desempenho (FPLC ÅKTA - Amersham Biosciences, Suécia) equipado com uma coluna Superdex peptide 10/300 GL, com 30% de acetonitrila e ácido trifluoroacético 0,1% como eluente. O volume de exclusão da coluna foi estimado com blue dextran 2000. O fluxo utilizado foi de 0,5 mL/min e as leituras foram realizadas a 280nm. Para determinação quantitativa dos pesos moleculares foram integradas as áreas dos picos dos cromatogramas. Foi preparada uma curva de calibração com ribonuclease A (13700 Da), aprotinina (6500 Da), angiotensina I (1296 Da) e triptofano (204 Da) (Pires et al., 2008).

8.2.6 Determinação de cor

A cor dos hidrolisados liofilizados foi medida com um colorímetro (Macbeth, modelo Color-Eye® 3000, New Windsor, EUA). Antes de iniciar a medição o equipamento foi calibrado e as amostras foram avaliadas através dos parâmetros luminosidade L^* (branco, + ou preto, -) e cromaticidade a^* (verde, - ou vermelho, +) e b^* (azul, - ou amarelo, +). Para uma melhor avaliação da cor, foram combinadas as três coordenadas mencionadas de modo a obter os valores do índice de brancura (IB) calculada pela equação 1, conforme Fujii et al. (1973).

$$IB = 100 - [(100 - L^*)^2 + a^{*2} + b^{*2}]^{1/2} \quad (1)$$

8.2.7 Determinação da atividade antioxidante

8.2.7.1 Inibição da peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi determinada *in vitro* a partir da habilidade dos hidrolisados em inibir a oxidação de uma emulsão contendo ácido linoléico (Osawa e Namiki, 1985). Amostras de hidrolisado (5,0 mg) ou padrão α -tocoferol (0,2 mg/mL) foram dissolvidas em

10 mL de tampão fosfato pH 7,0 (50 mmol/L), adicionou-se 0,13 mL de ácido linoléico e 10 mL de etanol 99,5% em tubos com tampa de rosca. A mistura foi homogeneizada e o volume final foi ajustado para 25 mL com água deionizada. Foi preparada uma reação controle usando o mesmo procedimento, com substituição da amostra protéica por tampão fosfato pH 7,0 (50 mmol/L). O conteúdo dos tubos foi incubado a 40 °C no escuro e o grau de oxidação do ácido linoléico foi medido de acordo com Mitsuda et al. (1966) em intervalos de 24 h durante 7 dias. Alíquotas de 100 µL da solução incubada foram misturadas com 4,7 mL de etanol 75% seguido da adição de 100 µL de tiocianato de amônio 30% e 100 µL de solução de cloreto ferroso 0,02mol/L em HCl 3,5%. Após 3 min, o grau de desenvolvimento de cor, que representa a oxidação do ácido linoléico foi medido a 500 nm em espectrofotômetro (Biospectro UV, modelo SP-22, Brasil). A inibição da peroxidação apresentada pelos hidrolisados calculada conforme a equação 2, onde: Abs = absorvância.

$$\text{Inibição (\%)} = [1 - (\text{Abs}_{\text{amostra}} / \text{Abs}_{\text{controle}})] \times 100 \quad (2)$$

8.2.7.2 Capacidade de sequestro do radical hidroxila

A capacidade dos hidrolisados inibir radicais hidroxila formados pela reação de Fenton, mediante degradação da 2-desoxi-D-ribose foi determinado conforme Chung et al., (1997). Uma mistura contendo 0,2 mL de FeSO₄.7H₂O 10 mmol/L, 0,2 mL de EDTA 10 mmol/L, 0,2 mL de 2-desoxi-D-ribose 10 mmol/L, 0,2 mL de amostra (1 mg/mL) e 1 mL de solução tampão fosfato (0,2 mol/L, pH 7,4) foi homogeneizada com 0,2 mL de H₂O₂ 10 mmol/L e incubada a 37 °C por 4 h. Em seguida, 1 mL de TCA 2,8% e 1 mL de TBA 1% foram adicionados aos tubos. As amostras foram fervidas em banho-maria a 100 °C, durante 10 min e resfriadas por imersão em um banho de água e gelo por 5 min. A absorvância foi lida a 532 nm em espectrofotômetro UV/VIS (ATI UNICAM Helios, modelo Alfa, UK). O percentual de inibição foi calculado pela equação 3.

$$\text{Inibição (\%)} = [(\text{Abs}_{\text{controle}} - \text{Abs}_{\text{amostra}}) / \text{Abs}_{\text{controle}}] \times 100 \quad (3)$$

8.2.7.3 Capacidade de sequestro do radical livre DPPH

O efeito sequestrador do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) foi medido conforme descrito por Shimada et al. (1992) com modificações. Amostras de 1,0 mL em diferentes concentrações (0, 5, 1,0, 2,5 e 5,0 mg/mL), foram adicionadas em 1,0 mL de DPPH 0,1 mmol/L em etanol 95%. A mistura foi homogeneizada em vórtex (Phoenix, AP-56, Brasil) e mantida 30 min a temperatura ambiente. A absorvância resultante da solução foi medida a 517 nm em espectrofotômetro UV/VIS (ATI UNICAM Helios, modelo Alfa, UK). Menor absorvância representa uma maior atividade de sequestro do radical DPPH pelos

hidrolisados, a qual foi expressa de acordo com a equação 3 e os valores da concentração efetiva (concentração capaz de inibir 50% da oxidação, EC_{50}), foram estimados a partir da porcentagem de inibição, plotados em relação à concentração de hidrolisado.

8.2.7.4 Captura do radical livre ABTS

A atividade antioxidante foi determinada conforme Re et al. (1999), com modificações. ABTS, 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) foi dissolvido em água a uma concentração de 7 mmol/L. O cátion radical ($ABTS^+$) foi produzido pela reação da solução estoque de ABTS com persulfato de potássio 2,45 mmol/L (concentração final) deixando a mistura em repouso no escuro a temperatura ambiente por 16 h antes do uso. A solução estoque é usada por no máximo 3 dias. No momento do uso, a solução de $ABTS^+$ foi diluída com tampão fosfato de sódio pH 7,4 (5 mmol/L) até absorvância de $0,7 \pm 0,02$ a 734 nm. Após a adição de 20 μ L de amostra (5 mg/mL), adicionou-se 2 mL de solução diluída de $ABTS^+$, agitou-se em vórtex (Phoenix, AP-56, Brasil) e incubou-se em banho-maria a 30 °C durante 6 min. Realizou-se a leitura da absorvância a 734nm em espectrofotômetro UV/VIS (Hitachi U-2001, Japão). Como solução padrão, usou-se o antioxidante sintético Trolox (derivado hidrossolúvel do α -tocoferol) nas concentrações de 0 a 1500 μ Mmol/L em etanol e os resultados foram expressos como capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC) em mmol/g de amostra.

8.2.7.5 Poder Redutor

A capacidade dos hidrolisados para reduzir $Ferro^{3+}$ para $Ferro^{2+}$ foi medida espectrofotometricamente (Oyaizu, 1988). Um volume de 2 mL de amostra (5mg/mL) foi adicionado em 2 mL de tampão fosfato 0,2 mol/L (pH 6,6) e 2 mL de ferricianeto de potássio 1%. A seguir a mistura foi incubada a 50 °C durante 20 min, e após adicionou-se na reação 2 mL de TCA 10%. Uma alíquota (2 mL) foi misturada com 2 mL de água destilada e 0,4 mL de cloreto férrico 0,1% em tubos de ensaio. Após 10 min de reação, a absorvância da solução resultante foi lida a 700 nm em espectrofotômetro UV/VIS (ATI UNICAM Helios, modelo Alfa, UK). Ácido ascórbico (AA) foi usado como padrão para a construção de uma curva de calibração e o poder redutor foi expresso como μ mol de AA / g de amostra.

8.2.8 Determinação de grupos sulfidríla (-SH)

O teor total dos grupos sulfidríla (T-SH) foram determinados 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 algumas modificações. Amostras (100 mg) de

proteína liofilizada foram homogeneizadas durante 3 min com 50 mL de tampão fosfato 0,1 mol/L, pH 8,0, contendo EDTA 1 mmol/L, 6 mol/L uréia e 0,5 % SDS. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 9000 x *g* (Biosystems, modelo MPW-350/350R) durante 20 min. Em 3 mL do sobrenadante foram adicionados 30 µL do reagente de Ellman e a mistura foi incubada 15 min à temperatura ambiente. Após a reação, a absorbância da mistura foi medida a 412 nm em espectrofotômetro (Biospectro UV, modelo SP-22, Brasil) e os grupos R-SH determinados utilizando um coeficiente de extinção molar de 14150 M⁻¹ cm⁻¹.

8.2.9 Análise Estatística

Todas as determinações foram realizadas em triplicata. Os dados para os diferentes parâmetros foram comparados através de análise de variância (ANOVA) com o auxílio do programa STATISTICA[®] versão 6.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, EUA). As diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os resultados foram identificadas usando teste de Tukey.

8.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

8.3.1 Hidrólise enzimática do músculo de peixe e de frango

Considerando que as enzimas têm posições específicas para clivagem da cadeia polipeptídica segundo Bougateg et al. (2010), no presente estudo, proteína de músculo de peixe e proteína de músculo de frango foram hidrolisadas separadamente pelas enzimas Flavourzyme, α -Quimotripsina e Tripsina, para a obtenção de peptídeos antioxidantes. As curvas das reações de hidrólise com Flavourzyme, α -Quimotripsina e Tripsina, após 4 h de reação, estão mostradas na Figura 1. Os valores de GH obtidos aumentaram com o aumento do tempo de hidrólise. Observou-se uma maior taxa de conversão na primeira hora de reação e após prosseguiu de modo mais lento indicando que a clivagem máxima das proteínas ocorreu durante os primeiros 60 min de hidrólise semelhante aos resultados relatados por Fonkwe e Singh (1996), Benjakul e Morrissey (1997) e Guerard et al. (2002). O GH é um importante fator, amplamente relacionado com o rendimento do processo de hidrólise (Shahidi et al., 1994). Em geral, os hidrolisados obtidos com castanha apresentaram valores maiores de GH que os hidrolisados de frango. Isso indica que as proteínas de peixe são mais facilmente hidrolisadas que as proteínas de frango. Considerando o mesmo substrato protéico e a mesma quantidade de enzima, o valor de GH dos produtos obtidos com α -Quimotripsina foram significativamente maiores ($p < 0,05$), que os hidrolisados obtidos com Tripsina e Flavourzyme.

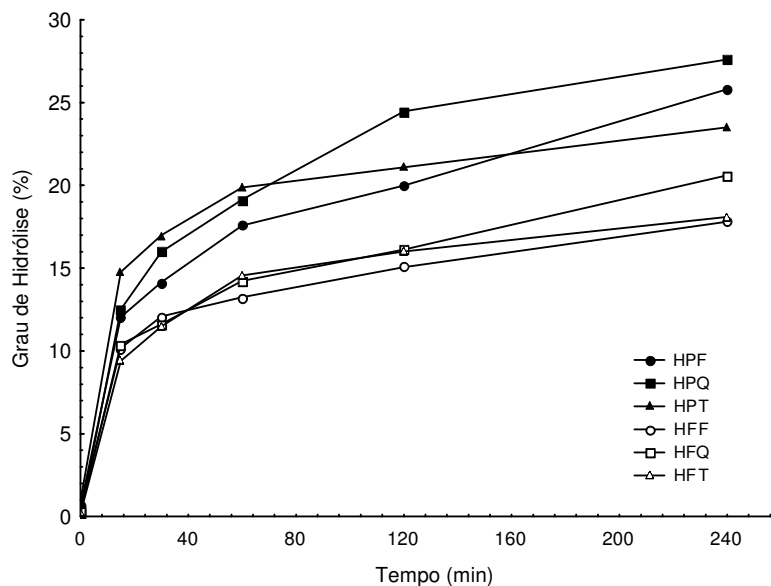


Figura 1. Curvas de hidrólise para músculo de castanha e frango tratados com diferentes enzimas. HPF = hidrolisado de músculo de pescado com Flavourzyme; HPQ = hidrolisado de músculo de pescado com α -Quimotripsina; HPT = hidrolisado de músculo de pescado com Tripsina; HFF = hidrolisado de músculo de frango com Flavourzyme; HFQ = hidrolisado de músculo de frango com α -Quimotripsina; HFT = hidrolisado de músculo de frango com Tripsina.

Após 4 h ao término das reações, os valores de GH para pescado e frango foram: 27,6% e 20,6% com α -Quimotripsina, 23,5% e 18,1% com Tripsina e 25,9% e 17,8% com Flavourzyme, respectivamente. A forma das curvas de hidrólise é semelhante à relatada em estudos anteriores com sardinha (Quaglia e Orban, 1987; Bougatef et al., 2010), salmão (Kristinsson e Rasco, 2000b) e atum (Guérard et al., 2001).

8.3.2 Cor

Os hidrolisados liofilizados de pescado apresentaram cor levemente amarela, já os hidrolisados de frango resultaram em produtos de cor mais branca conforme os valores de L^* , a^* e b^* apresentados na Tabela 1. O HFT apresentou o menor valor de b^* (4,5) enquanto que HPQ foi o mais amarelado com valor de b^* de 11,8. Os valores de IB dos hidrolisados de músculo de pescado foram significativamente menores ($p < 0,05$) que os hidrolisados de músculo de frango, porém não diferiram em relação às enzimas empregadas em sua obtenção. Como as proteínas foram hidrolisadas extensivamente, o produto pode se tornar escuro, provavelmente devido à oxidação da mioglobina e do pigmento melanina presente nessas matérias-primas (Benjakul e Morrissey, 1997).

Hidrolisados de carpa prateada produzidos por Dong et al. (2008), apresentaram cor

mais amarelada ($L^* = 83,4$, $a^* = -2,56$, $b^* = 17,15$) em tempos de hidrólise prolongados (4 h), comparados aos hidrolisados de castanha obtidos nesse estudo. A diferença no tamanho dos peptídeos e na seqüência de aminoácidos dos hidrolisados também podem ser responsáveis por essa divergência, conforme relatado por You et al. (2009).

Tabela 1. Parâmetros de cor dos hidrolisados protéicos de músculo de pescado e de frango.

Amostras	L^*	a^*	b^*	(IB)
HPF	$86,4 \pm 2,17^a$	$0,02 \pm 0,00^a$	$10,1 \pm 0,25^a$	$82,9 \pm 1,65^a$
HPQ	$87,2 \pm 0,86^{a,c}$	$0,03 \pm 0,00^a$	$11,8 \pm 0,50^b$	$82,5 \pm 0,29^a$
HPT	$85,4 \pm 0,55^a$	$-0,10 \pm 0,03^b$	$11,0 \pm 0,16^c$	$81,7 \pm 0,35^a$
HFF	$92,0 \pm 0,12^b$	$-0,06 \pm 0,00^b$	$6,6 \pm 0,07^d$	$89,6 \pm 0,14^b$
HFQ	$90,5 \pm 0,42^{b,c}$	$-0,46 \pm 0,01^c$	$6,2 \pm 0,17^d$	$88,6 \pm 0,45^b$
HFT	$91,9 \pm 0,63^b$	$-0,74 \pm 0,01^d$	$4,5 \pm 0,01^e$	$90,7 \pm 0,55^b$

Valores correspondentes à média \pm desvio padrão. Valores médios com letras diferentes em cada coluna diferem significativamente ($p < 0,05$). HPF = hidrolisado de músculo de pescado com Flavourzyme; HPQ = hidrolisado de músculo de pescado com α -Quimotripsina; HPT = hidrolisado de músculo de pescado com Tripsina; HFF = hidrolisado de músculo de frango com Flavourzyme; HFQ = hidrolisado de músculo de frango com α -Quimotripsina; HFT = hidrolisado de músculo de frango com Tripsina.

8.3.4 Atividade antioxidante dos hidrolisados

Hidrolisados protéicos produzidos usando diferentes enzimas provavelmente possuem peptídeos de diferentes tamanhos e seqüência de aminoácidos que podem determinar a sua capacidade antioxidante. Os hidrolisados de pescado e frango foram liofilizados e suas atividades antioxidantes foram avaliadas usando diferentes ensaios incluindo inibição da peroxidação do ácido linoléico, capacidade de sequestro do radical hidroxila (OH^*), capacidade de sequestro do radical livre DPPH, capacidade de sequestro do radical livre ABTS e poder redutor.

8.3.4.1 Inibição da peroxidação lipídica

Como mostrado na Tabela 2, a oxidação do ácido linoléico foi marcadamente inibida pelos hidrolisados derivados de proteína de músculo de pescado e de frango com as diferentes proteases utilizadas. Entre os hidrolisados produzidos com músculo de pescado, a maior atividade antioxidante foi observada naqueles obtidos com Flavourzyme, que exerceu cerca de 67,1% de inibição da peroxidação do ácido linoléico.

Entre os hidrolisados produzidos com músculo de frango, o hidrolisado de α -Quimotripsina foi o que apresentou a maior inibição (58,5%), no entanto essa inibição foi

menor comparada com o antioxidante comercial α -tocoferol (78,1% de inibição). Outros hidrolisados mostraram menor inibição da peroxidação lipídica.

Tabela 2. Atividade antioxidante dos hidrolisados protéicos de músculo de peixe e de frango determinada por diferentes ensaios.

Amostras	Inibição da oxidação lipídica (%)	Sequestradores de Radicais Livres			Poder Redutor ($\mu\text{mol/g}$)
		Hidroxila (%)	DPPH (%)	ABTS (mmol/g)	
HPF	67,1 \pm 1,04 ^a	48,7 \pm 2,94 ^a	64,9 \pm 0,98 ^a	0,914 \pm 0,02 ^a	328,4 \pm 0,42 ^a
HPQ	61,8 \pm 0,37 ^b	20,5 \pm 2,00 ^b	64,6 \pm 0,70 ^a	0,895 \pm 0,05 ^a	321,4 \pm 2,96 ^a
HPT	13,5 \pm 0,89 ^c	6,5 \pm 0,71 ^c	41,7 \pm 0,82 ^b	0,115 \pm 0,01 ^c	187,7 \pm 0,91 ^b
HFF	46,8 \pm 2,02 ^d	14,5 \pm 1,17 ^b	38,6 \pm 0,95 ^{b,c}	0,652 \pm 0,01 ^b	214,4 \pm 1,20 ^c
HFQ	58,5 \pm 0,39 ^e	12,8 \pm 0,68 ^{b,c}	49,0 \pm 0,91 ^d	0,689 \pm 0,02 ^b	222,1 \pm 2,41 ^c
HFT	18,2 \pm 0,51 ^f	6,4 \pm 0,75 ^c	34,3 \pm 1,46 ^c	0,255 \pm 0,02 ^d	161,5 \pm 1,68 ^d

Valores correspondentes à média \pm desvio padrão. Valores médios com letras diferentes em cada coluna diferem significativamente ($p < 0,05$). HPF = hidrolisado de músculo de peixe com Flavourzyme; HPQ = hidrolisado de músculo de peixe com α -Quimotripsina; HPT = hidrolisado de músculo de peixe com Tripsina; HFF = hidrolisado de músculo de frango com Flavourzyme; HFQ = hidrolisado de músculo de frango com α -Quimotripsina; HFT = hidrolisado de músculo de frango com Tripsina.

8.3.4.2 Capacidade de sequestro do radical hidroxila

O radical hidroxila é uma das principais espécies ativas de oxigênio com alta reatividade química. Este reage mais facilmente com aminoácidos, DNA e componentes da membrana, podendo causar significativos danos biológicos às células. Além disso, o radical hidroxila é um poderoso oxidante particularmente de lipídios (Batista et al., 2010). Assim, sua remoção ou inativação é um meio de defesa mais eficaz contra o desenvolvimento de várias doenças (Je et al., 2009). Na Tabela 2 estão apresentados os resultados do sequestro de radicais hidroxila pelos hidrolisados de músculo de peixe e frango. O HPF apresentou potencial sequestrante (48,7%) significativamente maior ($p < 0,05$) entre os seis hidrolisados estudados, seguido pelo HPQ (20,5%). Em relação aos hidrolisados produzidos com a enzima Flavourzyme, que apresentaram valores altos de GH (25,9%) foi observado maior capacidade de sequestro do radical hidroxila. Entre os hidrolisados de frango, HFF e HFQ exibiram maior atividade de sequestro do radical hidroxila que o HFT, porém não apresentaram diferença significativa entre si. Comparando esses resultados com hidrolisado de músculo de dojô (*Misgurnus anguillicaudatus*), a atividade antioxidante encontrada foi relativamente baixa (You et al., 2009). No entanto, essa atividade antioxidante dos

hidrolisados protéicos de pescado e frango foram similares aos valores relatados para hidrolisados de carpa prateada (Dong et al., 2008).

Observou-se em geral, que os hidrolisados de músculo de pescado mostraram maiores valores de GH e atividade de sequestro do radical hidroxila maior que os hidrolisados de músculo de frango, indicando que o tamanho dos peptídeos desempenha um papel importante na sua capacidade de sequestrar radicais livres. A atividade antioxidante dos hidrolisados protéicos depende também do tipo de enzima e das condições de hidrólise empregadas (Jao e Ko, 2002; Jun et al, 2004).

8.3.4.3 Capacidade de sequestro do radical livre DPPH

O DPPH é um radical livre estável que tem sido amplamente usado para testar a habilidade de captura de radicais livres de várias amostras (Jao e Ko, 2002; Saiga et al., 2003; Klompong et al., 2007; Thiansilakul et al., 2007; Raghavan et al., 2008). Quando DPPH encontra uma substância doadora de prótons (H^+), o radical é capturado, e isso pode ser observado através da mudança da cor púrpura para amarela, ocorrendo diminuição dos valores de absorbância (Liu et al., 2010). Em nosso teste, todos os hidrolisados reduziram o radical DPPH a um composto de cor amarela, aparentemente devido ao DPPH aceitar um elétron ou um hidrogênio para tornar-se uma molécula diamagnética estável. A atividade de sequestrar radicais DPPH exibida pelos hidrolisados de pescado e frango estão apresentados na Tabela 2. Não foi observada diferença significativa ($p>0,05$) na porcentagem de inibição entre os hidrolisados de pescado produzidos com as enzimas Flavourzyme e α -Quimotripsina. Esse resultado foi melhor que o obtido por Wu et al. (2003), com hidrolisados de cavala (*Scomber austriasicus*), que apresentou efeito sequestrante de 15,4%. Os valores EC_{50} foram estimados a partir da porcentagem de inibição e plotados em relação à concentração de hidrolisado. A concentração efetiva (mg/mL) necessária para inibir 50% da peroxidação foi: HPF ($3,1\pm 0,04$) > HFF ($3,4\pm 0,12$) > HFQ ($4,5\pm 0,29$) > HPQ ($5,1\pm 0,21$) > HPT ($5,5\pm 0,39$) > HFT ($7,7\pm 0,58$). Segundo esses autores, a atividade antioxidante depende da especificidade da enzima, das condições de hidrólise empregadas, do tamanho e composição dos peptídeos e da composição de aminoácidos livres. Assim, os resultados encontrados sugerem que alguns peptídeos contidos nos hidrolisados protéicos de pescado e frango foram consideravelmente potentes sequestradores de radicais livres.

8.3.4.4 Capacidade de sequestro do radical livre ABTS

O ensaio do radical ABTS é um método amplamente utilizado para triagem da atividade antioxidante e é relatado como um ensaio de descoloração aplicável tanto a compostos lipofílicos como hidrofílicos. Através da redução da cor do radical ABTS,

hidrolisados protéicos de várias fontes já foram identificados como antioxidantes potenciais (Miliauskas et al., 2004). $ABTS^+$ é um radical relativamente estável sendo facilmente reduzido por um antioxidante (Miller et al., 1993). Os resultados revelaram que os hidrolisados de pescado e de frango contêm peptídeos potencialmente doadores de elétrons e podem reagir com os radicais livres a fim de convertê-los em produtos mais estáveis, e cessar a reação radicalar em cadeia. Os resultados da capacidade de sequestro do radical $ABTS$, expresso em valores de TEAC estão apresentados na Tabela 2. Hidrolisados de pescado e frango mostraram diferentes atividades. Os valores de TEAC variaram de 0,115 a 0,914 mmol/g de amostra. O maior potencial de sequestro (0,914 mmol/g) foi encontrado para o HPF, seguido pelo HPQ (0,895 mmol/g), HFQ (0,689 mmol/g) e HFF (0,652 mmol/g). Os resultados obtidos com os hidrolisados produzidos com as enzimas Flavourzyme e α -Quimotripsina mostraram elevada capacidade de capturar radicais livres e podem reduzir respectivamente, em torno de 90 e 89% para pescado e 69 e 65% para o frango os radicais $ABTS$, com concentração de amostra de 5 mg/mL. No entanto, os hidrolisados produzidos com a enzima Tripsina apresentaram os menores valores de inibição do radical $ABTS$. O resultado indica que os peptídeos produzidos podem ser diferentes em termos de composição de aminoácidos, seqüência e comprimento da cadeia (Khantaphant e Benjakul, 2008).

8.3.4.5 Poder Redutor

A capacidade de redução de um determinado composto pode servir como um indicador de sua atividade antioxidante potencial. É possível observar a redução do Fe^{3+} (na forma de ferricianeto), para a forma ferrosa (Fe^{2+}), na presença de um composto antioxidante, através da mudança da cor amarela da solução para tons de verde e azul, formando o composto azul da Prússia (Ferreira et al., 2007). O poder redutor dos hidrolisados de pescado produzidos com Flavourzyme (328,4 μ mol/g) e α -Quimotripsina (321,4 μ mol/g) foi alto não apresentando diferença significativa ($p > 0,05$) entre ambos, sendo o mesmo observado para os hidrolisados de frango (Tabela 2). Assim como para o radical $ABTS$, o poder redutor foi maior para os hidrolisados que exibiram maior GH, sugerindo uma relação direta com a capacidade de doar elétrons a radicais livres e convertê-los em produtos mais estáveis, interrompendo reações em cadeia (Ferreira et al., 2007). A mesma tendência também foi mostrada com hidrolisados de cavala e autolisados em períodos crescentes de hidrólise (Wu et al., 2003).

8.3.5 Distribuição do peso molecular dos hidrolisados

A distribuição do peso molecular dos hidrolisados de pescado e de frango foram determinadas por cromatografia de filtração em gel e o perfil de ambas as matérias-primas mostrou a presença de moléculas protéicas com pesos moleculares predominantemente abaixo de 6 kDa. A Tabela 3 mostra que a fração <3 kDa foi a principal componente para cada um dos seis hidrolisados seguido da fração <1 kDa (contida na fração <3 kDa). Considerando a área do pico da fração <3 kDa, a ordem, com base na porcentagem de área, para frango foi: HFQ (92,4%) > HFF (83,0%) > HFT (71,6%), e para pescado: HPF (60,8%) > HPQ (51,0 %) > HPT (50,8 %), a qual está diretamente em relacionada com a atividade antioxidante.

Tabela 3. Distribuição de peso molecular dos hidrolisados protéicos de pescado e de frango por cromatografia de filtração em gel.

Peso molecular estimado (kDa)	Área do pico (%) ^a					
	HPF	HPQ	HPT	HFF	HFQ	HFT
>6	3,4 ± 0,2	0,7 ± 0,1	0,2 ± 0,1	3,5 ± 0,2	0,5 ± 0,1	7,1 ± 0,5
3-6	35,8 ± 3,4	48,4 ± 5,5	49,0 ± 2,2	13,5 ± 0,6	7,1 ± 1,1	21,3 ± 2,9
<3	60,8 ± 5,7	51,0 ± 5,9	50,8 ± 6,8	83,0 ± 3,9	92,4 ± 7,1	71,6 ± 7,4
<1	44,1 ± 4,3	50,9 ± 5,8	50,8 ± 6,8	78,6 ± 3,7	84,1 ± 5,5	71,6 ± 7,4

^a Valores correspondentes a média ± desvio padrão. HPF = hidrolisado de músculo de pescado com Flavourzyme; HPQ = hidrolisado de músculo de pescado com α -Quimotripsina; HPT = hidrolisado de músculo de pescado com Tripsina; HFF = hidrolisado de músculo de frango com Flavourzyme; HFQ = hidrolisado de músculo de frango com α -Quimotripsina; HFT = hidrolisado de músculo de frango com Tripsina.

O resultado indicou que a fração <3 kDa foi a que apresentou maior associação com a atividade antioxidante dos hidrolisados. Destes, as proteases mais eficazes para hidrolisar proteínas de pescado e frango foram a Flavourzyme e α -Quimotripsina, respectivamente.

8.3.6 Determinação de grupos sulfidril (-SH)

Estudos recentes têm mostrado que a chave para a função antioxidante está fortemente ligada aos grupos SH (Collinson et al., 2002) que atuam como doadores de elétrons ao interagir diretamente com os radicais (Patterson e Rhoades, 1988). HPF apresentou significativamente ($p < 0,05$) maior conteúdo de grupos sulfidril totais ($4,7 \pm 2,6$

$\mu\text{mol/g}$ de proteína) seguido pelo HFF ($2,7\pm 1,4 \mu\text{mol/g}$ de proteína), HPQ ($2,5\pm 1,0 \mu\text{mol/g}$ de proteína), HFQ ($2,2\pm 1,1 \mu\text{mol/g}$ de proteína) HPT ($1,7\pm 0,9 \mu\text{mol/g}$ de proteína) e HFT ($1,4\pm 0,7 \mu\text{mol/g}$ de proteína). Isso, provavelmente, deve-se a atividade da Flavourzyme a qual contém, além de endoproteases em sua composição, exopeptidases, que são responsáveis pela maior liberação de aminoácidos livres. Conseqüentemente, os hidrolisados de Flavourzyme apresentam maior conteúdo de grupos sulfidrila livres, provavelmente devido à maior liberação de cisteína e peptídeos de baixo peso molecular contendo cisteína (Pacheco et al., 2005). Por outro lado, essa taxa foi menor comparada com a de isolado protéico de soro de leite (Roman e Sgarbieri, 2007) o que pode evidenciar a maior formação de ligações dissulfeto. O grupo SH da cisteína tem uma ação independentemente crucial devido a sua interação direta com radicais. Já tem sido relatado que grupos SH atuam como sequestradores de radicais livres em plantas e tecidos animais (Patterson e Rhoades, 1988), e grupos SH da cisteína facilitam a atividade antioxidante da glutatona (Selvam e Devaraj, 1996). Em nosso estudo, a atividade de sequestro de radicais pode ser devido ao considerável número de grupos sulfidrila presentes nos hidrolisados obtidos que, de acordo com Sarmadi e Ismail (2010), atuam como sequestradores de radicais protegendo os tecidos contra o estresse oxidativo. Além dos grupos sulfidrila, outros compostos antioxidantes como peptídeos contendo histidina ou tirosina, podem estar presentes nos hidrolisados e a atividade antioxidante pode representar o efeito combinado desses compostos.

8.4 CONCLUSÃO

Os hidrolisados com maiores valores de GH mostraram melhor capacidade antioxidativa. De acordo com esse estudo, os hidrolisados preparados a partir de pescado apresentaram cor amarelada, e os hidrolisados de frango cor branca. A atividade antioxidante, nos sistemas testados *in vitro*, indica que os peptídeos musculares de pescado e frango são potentes antioxidantes capazes de sequestrar os radicais livres e inibir a oxidação lipídica. O maior conteúdo de grupos SH do HPF provavelmente contribuiu para que esse hidrolisado mostrasse maior atividade antioxidante. No entanto, os efeitos dos hidrolisados de pescado e frango no sabor, e na qualidade alimentar, e a identificação dos peptídeos responsáveis pela sua capacidade antioxidante geral precisam ainda ser estudados.

8.5 AGRADECIMENTOS

Esse trabalho foi financiado pela CAPES e CNPq (Concessão 305055/2006-2), e pela Comunidade Européia, através do Projeto Chill-On (FP 6- 409 016333-2).

8.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER-NISSEN J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 27, n. 6, p. 1256-1262, 1979.

BATISTA, I.; RAMOS, C.; COUTINHO, J.; BANDARRA, N. M.; NUNES, M.L. Characterization of protein hydrolysates and lipids obtained from black scabbardfish (*Aphanopus carbo*) by-products and antioxidative activity of the hydrolysates produced. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 18-24, 2010.

BENJAKUL, S.; MORRISSEY, M. Protein hydrolysates from Pacific whiting solid wastes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 9, p. 3423-3430, 1997.

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

CHUNG, S. K.; OSAWA, T.; KAWAKISHI, S. Hydroxyl radical scavenging effect of spices and scavengers from Brown Mustard (*Brassica nigra*). **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 61, p.118-24, 1997.

COLLINSON, E. J.; WHEELER, G. L.; GARRIDO, E. O.; AVERY, A. M.; AVERY, S. V.; GRANT, C. The Yeast Glutaredoxins are Active as Glutathione Peroxidases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 19, p. 16712- 16717, 2002.

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.

ERICKSON, M. C.; HULTIN, H. O. Influence of histidine on lipid peroxidation in sarcoplasmic reticulum. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 292, p. 427-432, 1992.

FARIA, M. G.; BATISTA, I. Actividade antioxidante de hidrolisados proteicos de bacalhau, salmão e solha. **Relatórios Científicos e Técnicos, IPIMAR**, Série digital (<http://ipimar-iniap.ipimar.pt>), n. 36, 2007, 31p.

FERREIRA, I. C. F. R.; BAPTISTA, P.; VILAS-BOAS, M.; BARROS, L. Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from Northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. **Food Chemistry**, v. 100, p. 1511-1516, 2007.

FOH, M. B. K.; QIXING, J.; AMADOU, I.; XIA, W.S. Influence of ultrafiltration on antioxidant activity of tilapia (*Oreochromis niloticus*) protein hydrolysate. **Advance Journal of Food Science and Technology**, v. 2, n. 5, p. 227-235, 2010.

FONKWE, L. G.; SINGH, R. K.; Protein recovery from mechanically deboned turkey residue by enzymic hydrolysis. **Process Biochemistry**, v. 31, n. 6, p. 605-616, 1996.

FUJII, Y.; WATANABE, K.; MARUYAMA, Y. Relation between the ATP-breakdown in ice-stored Alaska Pollack meat and the quality of frozen surimi. **Bulletin of Tokai Regional Fisheries Research Laboratory**, v. 75, p. 7-11, 1973.

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

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

HAIMOVICI, M.; ABSALONSEN, L.; VELASCO, G.; MIRANDA, L. V. 2006. Diagnóstico do estoque e orientações para o ordenamento da pesca de *Umbrina canosai* (Berg, 1895). In: ROSSI-WONGTSCHOWSKI, C. L. D. B.; ÁVILA-DA-SILVA, A. O.; CERGOLE, M. C. (Ed.) **Análise das Principais Pescarias Comerciais da Região Sudeste-Sul do Brasil: Dinâmica Populacional das Espécies em Exploração – II**. São Paulo: USP, p. 77-85.

JAO, C.L.; KO, W. C. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging by protein hydrolysates from tuna cooking juice. **Fisheries Science**, v. 68, p. 430-435, 2002.

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

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

KHANTAPHANT, S.; BENJAKUL, S. Comparative study on the proteases from fish pyloric caeca and the use for production of gelatin hydrolysate with antioxidative activity. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 151, p. 410-419, 2008.

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

KRISTINSSON, H. G.; RASCO, B. A. Biochemical and functional properties of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle hydrolyzed with various alkaline proteases. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 48, p. 657-666, 2000b.

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.

LIU, Q.; KONG, B.; XIONG, Y. L.; XIA, X. Antioxidant activity and functional properties of porcine plasma protein hydrolysate as influenced by the degree of hydrolysis. **Food Chemistry**, v. 118, p. 403-410, 2010.

MILIAUSKAS, G.; VENSKUTONISA, P. R.; VAN BEEKB, T. A. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. **Food Chemistry**, v. 85, p. 231-237, 2004.

MILLER, N. J.; RICE-EVANS, C.; DAVIES, M. J.; GOPINATHAN, V.; MILNER, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. **Clinical Science**, v. 84, p. 407-412, 1993.

MITSUTA, H., YASUMOTO, K., IWAMI, K., Antioxidative action of indole compounds during the autoxidation of linoleic acid. **Eiyo to Shokuryo**, v. 19, p. 210-214, 1966.

OSAWA, T.; NAMIKI, M. Natural antioxidants isolated from eucalyptus leaf waxes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 33, n. 5, p. 777-780, 1985.

OYAIZU, M. Antioxidative activities of browning products of glucosamine fractionated by organic solvent and thin-layer chromatography. **Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi**, v. 35, p. 771-775, 1988.

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 protéicos de soro de leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n.2, p. 333-338, 2005.

PATTERSON, C. E.; RHOADES, R. A. Protective role of sulfhydryl reagents in oxidant lung injury. **Experimental Lung Research**, v. 14, p. 1005-1019, 1988.

PIRES, C.; BATISTA, I.; GODINHO, V.; NUNES, M. L. Functional and biochemical characterization of proteins remaining in solution after isoelectric precipitation. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 17, n.1, p. 60-72, 2008.

POKORNY, J. Natural antioxidants for food use. **Trends in Food Science and Technology**, v. 2, p. 223-227, 1991.

QUAGLIA, G. B.; ORBAN, E. Enzymic solubilisation of proteins of Sardine (*Sardina pilchardus*) by commercial proteases. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, p. 263-239, 1987.

RAGHAVAN, S.; KRISTINSSON, H. G.; LEEUWENBURGH, C. Radical scavenging and reducing ability of tilapia (*Oreochromis niloticus*) protein hydrolysates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 10359 -10367, 2008.

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 Biology and Medicine**, v. 26, p. 1231-1237, 1999.

ROMAN, J. A.; SGARBIERI, V. C. Caracterização físico-química do isolado protéico de soro de leite e gelatina de origem bovina. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 10, n. 2, p. 137-143, 2007.

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

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

SELVAM, R.; DEVARAJ, S. Oxalate binding to rat kidney mitochondria: induction by oxidized glutathione. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, v. 33, p. 62-65, 1996.

SHAHIDI, F. Seafood Processing Byproducts. In: Shahidi, F. and J.R. Botta (Eds.), **Seafoods: Chemistry, Processing Technology and Quality**, 1st Edn., Blackie, London, U.K., p. 321-324. 1994.

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.

SHIMADA, K., FUJIKAWA, K., YAHARA, K. AND NAKAMURA, T. Antioxidative properties of xanthan on the antioxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, v. 40, n. 6, p. 945-948, 1992.

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

UBABEF - **União Brasileira de Avicultura** - O frango pelo mundo. (Disponível em: <<http://www.brazilianchicken.com.br/industria-avicola/o-frango-pelo-mundo.php>>. Acesso

em: 10 de dezembro de 2009.

WU, H. C.; CHEN, H. M.; SHIAU, C. Y. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). **Food Research International**, v. 36, p. 949-957, 2003.

WU, H. C.; SUN, P. B.; CHANG, C. L.; SHIAU, C. Y. Low-molecular-weight peptides as related to antioxidant properties of chicken essence. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 13, n. 2, p. 176-183, 2005.

YOU, L.; ZHAO, M.; CUI, C.; ZHAO, H.; YANG, B. Effect of degree of hydrolysis on the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 10, p. 235-240, 2009.

**9 FRACIONAMENTO DE HIDROLISADOS PROTÉICOS DE PESCADO E FRANGO
UTILIZANDO ULTRAFILTRAÇÃO POR MEMBRANAS: INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE**

FRACIONAMENTO DE HIDROLISADOS PROTÉICOS DE PESCADO E FRANGO UTILIZANDO ULTRAFILTRAÇÃO POR MEMBRANAS: INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Graciela Salette Centenaro, Myriam Salas-Mellado, Carla Pires, Irineu Batista, Maria Leonor Nunes, Carlos Prentice Hernández

RESUMO

Nesse trabalho, peptídeos de pescado e frango foram obtidos usando as enzimas proteolíticas Flavourzyme e α -Quimotripsina. O músculo foi hidrolisado por 4 h e os peptídeos resultantes foram avaliados. Foram produzidos hidrolisados de castanha (*Umbrina canosa*) com grau de hidrólise (GH) de 25,9 e 27,6% e hidrolisados de frango (*Gallus domesticus*) com GH de 17,8 e 20,6%, respectivamente para Flavourzyme e α -Quimotripsina. A ultrafiltração por membranas foi utilizada para separar os hidrolisados de pescado e frango com Flavourzyme e α -Quimotripsina baseada em pesos moleculares de corte >1000 Da, <1000 e >500 Da e <500 Da, para produzir frações (F1000, F1000-500 e F500) com atividade antioxidante. HPF e HPQ apresentaram 60,8 e 50,9% de peptídeos com peso molecular <3 kDa em sua composição, respectivamente. Observou-se para HFF e HFQ 83 e 92,4 % de peptídeos com peso molecular <3 kDa. A fração que apresentou, em geral, maior potencial antioxidante foi F1000 do hidrolisado de pescado obtido com a enzima Flavourzyme. Quando se adicionaram 40mg/mL de HPF e HFQ, 93 e 80% da oxidação lipídica em homogeneizados de carne moída bovina, foi inibida, respectivamente. A composição de aminoácidos indicou maior conteúdo de aminoácidos hidrofóbicos e aminoácidos contendo resíduos sulfúricos para o HPF, o qual mostrou maior potencial antioxidante.

Palavras-chave: atividade antioxidante; hidrolisados; peso molecular de corte; ultrafiltração por membranas

ABSTRACT

In this work, chicken and fish peptides were obtained using the proteolytic enzymes α -Chymotrypsin and Flavourzyme. The muscle was hydrolyzed for 4 h and the resulting peptides were evaluated. Hydrolysates were produced from Argentine croaker (*Umbrina canosa*) with degree of hydrolysis (DH) of 25.9 and 27.6% and from chicken (*Gallus domesticus*) with DH of 17.8 and 20.6% respectively for Flavourzyme and α -Chymotrypsin. Membrane ultrafiltrations was used to separate fish and chicken hydrolysates from Flavourzyme and α -Chymotrypsin based on molecular weight cut-offs >1000 Da, <1000 and >500 Da and <500 Da, to produce fractions (F1000, F1000-500 and F500) with antioxidant activity. HPF and HPQ showed 60.8 and 50.9% of peptides with molecular weight <3 kDa in its composition, respectively. To HFF and HFQ was observed 83 and 92.4% of peptides with molecular weight <3 kDa. The fraction that showed, in general, higher antioxidant potential was F1000 from fish hydrolysate obtained with Flavourzyme. When added 40mg/ml of HPF and HFQ, 93 and 80% of lipid oxidation in ground beef homogenates was inhibited, respectively. The composition of amino acids indicated higher amino acids hydrophobic content and amino acids containing sulfuric residues for HPF, which showed antioxidant potential.

Keywords: antioxidant activity; hydrolysate; ultrafiltration membranes; cut-off

9.1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, vem aumentando o interesse em identificar e caracterizar peptídeos bioativos obtidos a partir de plantas e animais. Os peptídeos bioativos são considerados fragmentos protéicos específicos que estão inativos na estrutura molecular das proteínas. Depois de serem liberados por hidrólise enzimática, podem exercer funções fisiológicas (Sarmadi e Ismail, 2010). A hidrólise enzimática de proteínas tem sido extensivamente usada e se destaca por melhorar as propriedades funcionais e nutricionais dos ingredientes alimentícios produzidos. Vários trabalhos já foram publicados em nosso laboratório mostrando que as proteínas tiveram suas propriedades funcionais melhoradas após processos de hidrólise (Salas-Mellado et al., 2007; Centenaro et al., 2009; Fontana et al., 2009; Martins et al., 2009).

Inúmeros peptídeos derivados de proteínas alimentícias hidrolisadas têm demonstrado propriedades bioativas. Esses peptídeos apresentam tamanho de 2 a 20 aminoácidos (Meisel e Fitzgerald, 2003) e peso molecular inferior a 6000 Da (Sun et al., 2004). Com base em suas propriedades estruturais, sua composição e seqüência de aminoácidos, estes peptídeos podem desempenhar várias funções, tais como: imunomodulatória (Gauthier et al., 2006), antimicrobiana (McCann et al., 2006), antitrombótica (Shimizu et al., 2008), hipocolesterolêmica (Zhong et al., 2007), anti-hipertensiva (Jia et al., 2010) e antioxidante (Mendis et al., 2005a; Wu et al., 2005; Je et al., 2009; Aewsiri et al., 2010; Bougatef et al., 2010). Além disso, diversos peptídeos foram também caracterizados por apresentarem propriedades multifuncionais (Meisel e Fitzgerald, 2003).

Pesquisas focadas nos peptídeos contidos nos hidrolisados protéicos de proteínas de origem animal demonstraram que eles contêm moléculas que podem trazer benefícios à saúde, as quais são promissoras para aplicações nutricionais e farmacêuticas (Guérard et al., 2005).

Os radicais livres são espécies que contêm um ou mais elétrons desemparelhados, que são produzidos no metabolismo celular normal ou patológico (Gulcin et al., 2003) e estão envolvidos na causa de muitas doenças crônicas como diabetes, doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e câncer. Superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (HO^\cdot), conhecidos como espécies reativas do oxigênio (ERO), são alguns dos radicais livres relatados por se formarem *in vivo* (Ekanayake et al., 2004). Nos alimentos, a peroxidação lipídica gerada pelos radicais livres, é uma das principais preocupações durante o processamento industrial e o armazenamento dos produtos, pois além de diminuir a qualidade nutricional e a segurança alimentar (Shih e Daigle, 2003), leva

ao desenvolvimento de produtos da reação potencialmente tóxicos, sabores e odores indesejáveis e alterações na textura, entre outros (Maillard et al., 1996; Je et al., 2009).

Os antioxidantes sintéticos como butil-hidroxianisol (BHA), butil-hidroxitolueno (BHT), propil galato e terc-butil hidroquinona (TBHQ), são usados para inibir ou retardar a formação de radicais livres, prevenindo a oxidação lipídica e a conseqüente deterioração dos alimentos. No entanto, a segurança e a percepção negativa dos antioxidantes sintéticos pelo consumidor, restringem suas aplicações em produtos alimentícios (Park et al., 2001). Embora os compostos sintéticos sejam eficientes e relativamente de baixo custo, atenção especial tem sido atribuída aos antioxidantes naturais, devido a uma tendência mundial de evitar ou minimizar o uso desses aditivos sintéticos (Shih e Daigle, 2003; Qian et al., 2008).

A tecnologia de ultrafiltração por membrana tem sido de grande importância para a purificação, concentração e fracionamento de vários produtos em diversas áreas, tais como indústrias alimentícias, farmacêuticas e biotecnológicas, e tem sido uma das melhores técnicas disponíveis para o enriquecimento de peptídeos (Foh et al., 2010). No entanto, há pouca informação à respeito da atividade antioxidante de hidrolisados protéicos de músculo de frango e nenhum trabalho foi encontrado sobre a atividade antioxidante de hidrolisados de castanha (*Umbrina canosai*). Nessa pesquisa, hidrolisados de pescado e frango foram produzidos enzimaticamente e fracionados utilizando técnica de ultrafiltração por membranas com pesos moleculares de corte de 1000 e 500 Da. Foram obtidas 3 frações (>1000 Da, <1000 e >500 Da e <500 Da) e suas atividades antioxidantes foram investigadas em conjunto com o perfil peptídico dessas frações e a composição de aminoácidos apresentada pelos hidrolisados protéicos. O objetivo do trabalho foi obter frações peptídicas a partir dos hidrolisados utilizando ultrafiltração por membranas, caracterizar os hidrolisados e as frações em relação à distribuição de peso molecular e avaliar a atividade antioxidante bem como verificar a atividade antioxidante dos hidrolisados em um sistema alimentício.

9.2 MATERIAL E MÉTODOS

9.2.1 Matérias-primas

A espécie de pescado utilizada foi a castanha (*Umbrina canosai*), doada pela indústria Pescal S/A, localizada na cidade de Rio Grande, RS, Brasil. Depois de capturado, o pescado foi filetado e o músculo (contendo 18,2% de proteína) foi triturado uniformemente e armazenado sob congelamento a -20 °C em sacos de polietileno até o momento do uso. O músculo de frango congelado (contendo 21,4% de proteína) foi doado pela Cia. Minuano de Alimentos localizada na cidade de Lajeado, RS, Brasil, e armazenado sob congelamento

a -20 °C em sacos de polietileno até o momento do uso.

9.2.2 Reagentes e Enzimas

Foram utilizadas as enzimas Flavourzyme 1000L[®] (mistura de endoprotease e exopeptidase de *Aspergillus oryzae*), doada pela Novozymes Latin America (Araucária, Brasil) e α -Quimotripsina (endopeptidase obtidas do pâncreas bovino) fornecida pela Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA). Todos os demais reagentes utilizados nesse estudo foram de grau analítico (p.a.).

9.2.3 Preparação dos Hidrolisados Protéicos

O músculo foi homogeneizado (agitador eixo-hélice IKA[®], modelo RW28, Staufen, Alemanha), com solução tampão fosfato 0,2 mol/L, na proporção de 1:3 (p/v), considerando sempre o conteúdo protéico. Antes do início da reação, as misturas foram pré-incubadas em reator de vidro encamisado (Figura 1, pág. 61) nas condições ótimas para cada enzima (50 °C e pH 7,0 para Flavourzyme e 37 °C e pH 8,0 para α -Quimotripsina) por 20 min. A reação de hidrólise iniciou com a adição de enzima na quantidade de 1% (p/p) com agitação a 600 rpm (agitador eixo-hélice IKA[®], modelo RW28, Staufen, Alemanha), durante 4 h.

Tomaram-se amostras em tempos preestabelecidos (zero, 15, 30, 60, 120, 240 min) para medir o grau de hidrólise (GH) conforme o método do ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) descrito por Alder-Nissen (1979) pela determinação da porcentagem de ligações peptídicas hidrolisadas através da medida do número de grupamentos amino livres no sobrenadante, pela reação com TNBS. Foi preparada uma curva padrão de leucina na concentração de 0 a 1,6 mmol/L.

Após o fim da reação, a enzima foi inativada termicamente a 85 °C por 15 min com agitação ocasional. Os hidrolisados foram centrifugados por 3500 x g (Biosystems, modelo MPW-350/350R) durante 20 min para remover resíduos não hidrolisados e o sobrenadante obtido foi liofilizado (liofilizador MicroModulyo, Edwards, Sussex, UK). Foram produzidos hidrolisados de pescado e frango com as enzimas Flavourzyme (HPF; HFF) e α -Quimotripsina (HPQ; HFQ).

9.2.4 Fracionamento por Ultrafiltração

Os hidrolisados foram fracionados utilizando uma célula de ultrafiltração (Advantec, UHP-76, Japan) com agitação magnética e capacidade de 450 mL (Figura 1). Foram

usadas membranas de ultrafiltração (Amicon Inc., Beverly, MA, EUA, de celulose regenerada, 76mm de diâmetro) com peso molecular de corte (cut-off) de 500 e 1000 Daltons. Durante cada processo de filtração aplicou-se pressão com gás nitrogênio, conforme determinação do fabricante das membranas. Um volume de amostra (10mg/mL) foi passado através de cada membrana onde foram coletadas 3 frações: retentado F1000 (fração >1000 Da), permeado e retentado F1000-500 (fração <1000 e >500 Da) e permeado F500 (fração <500 Da). Todas as frações foram liofilizadas e analisadas em seguida. As membranas foram substituídas por novos exemplares após 3 filtrações, considerando a avaliação do fluxo.

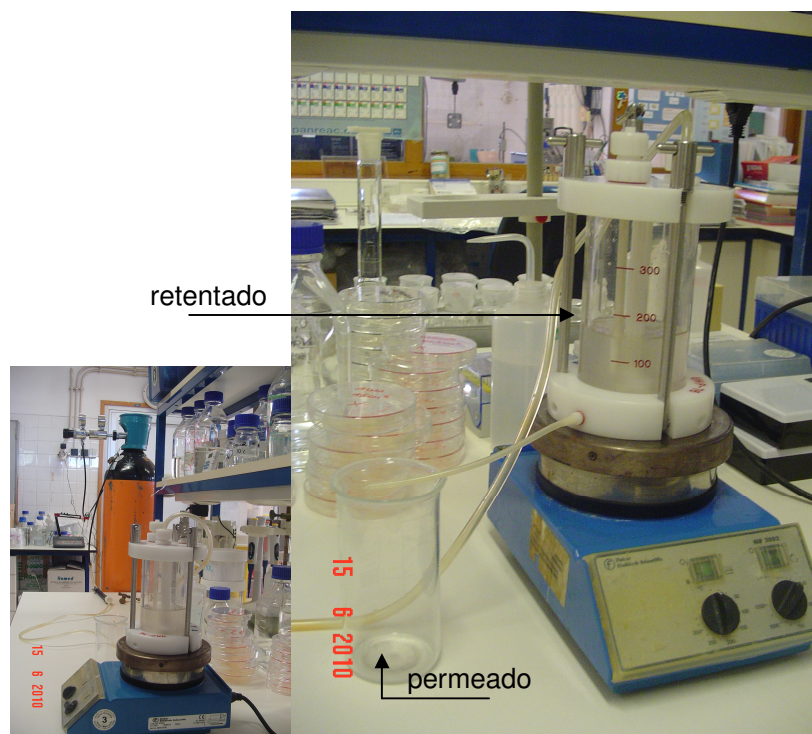


Figura 1. Sistema de ultrafiltração utilizado para o fracionamento dos hidrolisados.

9.2.5 Determinação da Distribuição do Peso Molecular

A distribuição do peso molecular dos hidrolisados protéicos foi estimada por cromatografia de filtração em gel em um cromatógrafo líquido de rápido desempenho (FPLC ÄKTA - Amersham Biosciences, Suécia) equipado com uma coluna Superdex peptide 10/300 GL, com 30% de acetonitrila e ácido trifluoracético 0,1% como eluente. O volume de exclusão da coluna foi estimado com blue dextran 2000. O fluxo utilizado foi de 0,5 mL/min e as leituras foram realizadas a 280nm. Para determinação quantitativa dos pesos moleculares foram integradas as áreas dos picos dos cromatogramas. Foi preparada uma curva de calibração com ribonuclease A (13700 Da), aprotinina (6500 Da), angiotensina I

(1296 Da) e triptofano (204 Da) (Pires et al., 2008).

9.2.6 Eletroforese dos hidrolisados

Foi utilizada a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) numa concentração de 12%, de acordo com Laemli (1970). Todas as amostras foram tratadas com β -mercaptoetanol 5%. Os géis foram submetidos a uma corrente elétrica de 0,02 A durante 1 h e em seguida, a corrente foi aumentada para 0,04 A por mais 1 h. Após a corrida, os géis foram corados com uma solução contendo metanol 50% (v/v), ácido acético glacial 6,8% (v/v) e Coomassie Brilliant Blue-R (1 mg/mL) por aproximadamente 3 h. Os géis foram descorados em uma solução contendo ácido acético 7,5% (v/v) e metanol 5% (v/v), renovando-se a solução até a revelação nítida do gel. O peso molecular das bandas foi determinado por comparação com padrão de peso molecular entre 10 a 220 kDa (Bench Mark™ Protein Ladder, Invitrogen, SP, Brasil).

9.2.7 Determinação da Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante das frações dos hidrolisados de pescado e frango foram avaliadas usando diferentes ensaios incluindo, capacidade de sequestro do radical hidroxila (OH^*), capacidade de sequestro do radical livre DPPH, capacidade de sequestro do radical livre ABTS e poder redutor.

9.2.7.1 Capacidade de sequestro do radical hidroxila

A capacidade das frações em inibir radicais hidroxila, formados pela reação de Fenton, mediante degradação da 2-desoxi-D-ribose foi determinado conforme Chung et al., (1997). Uma mistura contendo 0,2 mL de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 mmol/L, 0,2 mL de EDTA 10 mmol/L, 0,2 mL de 2-desoxi-D-ribose 10 mmol/L, 0,2 mL de amostra (1 mg/mL) e 1 mL de solução tampão fosfato (0,2 mol/L, pH 7,4) foi homogeneizada com 0,2 mL de H_2O_2 10 mmol/L e incubada a 37 °C por 4 h. Em seguida, 1 mL de TCA 2,8% e 1 mL de TBA 1% foram adicionados aos tubos. As amostras foram fervidas em banho-maria a 100 °C, durante 10 min e resfriadas por imersão em um banho de água e gelo por 5 min. A absorbância foi lida a 532 nm em espectrofotômetro UV/VIS (ATI UNICAM Helios, modelo Alfa, UK). O percentual de inibição foi calculado pela equação 1, onde: Abs = absorbância.

$$\text{Inibição (\%)} = \left[\frac{\text{Abs}_{\text{controle}} - \text{Abs}_{\text{amostra}}}{\text{Abs}_{\text{controle}}} \right] \times 100 \quad (1)$$

9.2.7.2 Capacidade de sequestro do radical livre DPPH

O efeito sequestrador do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) foi medido conforme descrito por Shimada et al. (1992) com modificações. Amostra de 1,0 mL em diferentes concentrações (0, 5, 1,0, 2,5 e 5,0 mg/mL), foi adicionada em 1,0 mL de DPPH 0,1 mmol/L em etanol 95%. A mistura foi homogeneizada em vórtex (Phoenix, AP-56, Brasil) e mantida 30 min a temperatura ambiente. A absorbância resultante da solução foi medida a 517 nm em espectrofotômetro UV/VIS (ATI UNICAM Helios, modelo Alfa, UK). Menor absorbância representa uma maior atividade de sequestro do radical DPPH, a qual foi calculada de acordo com a equação 1. Os valores da concentração efetiva (concentração capaz de inibir 50% da oxidação, EC_{50}), foram estimados a partir da porcentagem de inibição.

9.2.7.3 Capacidade de sequestro do radical livre ABTS

A atividade antioxidante foi determinada conforme Re et al. (1999), com modificações. ABTS, 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) foi dissolvido em água a uma concentração de 7 mmol/L. O cátion radical ($ABTS^+$) foi produzido pela reação da solução estoque de ABTS com persulfato de potássio 2,45 mmol/L (concentração final) deixando a mistura em repouso no escuro a temperatura ambiente por 16 h antes do uso. A solução estoque é usada por no máximo 3 dias. No momento do uso, a solução de $ABTS^+$ foi diluída com tampão fosfato de sódio pH 7,4 (5 mmol/L) até absorbância de $0,7 \pm 0,02$ a 734 nm. Após a adição de 20 μ L de amostra (5 mg/mL), adicionou-se 2 mL de solução diluída de $ABTS^+$, agitou-se em vórtex (Phoenix, AP-56, Brasil) e incubou-se em banho-maria a 30 °C durante 6 min. Realizou-se a leitura da absorbância a 734nm em espectrofotômetro UV/VIS (Hitachi U-2001, Japão). Como solução padrão, utilizou-se o antioxidante sintético Trolox (derivado hidrossolúvel do α -tocoferol) nas concentrações de 0 a 1500 μ M em etanol e os resultados foram expressos como capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC) em mmol/g de amostra.

9.2.7.4 Poder Redutor

A capacidade das frações hidrolisadas em reduzir $Ferro^{3+}$ para $Ferro^{2+}$ foi medida espectrofotometricamente (Oyaizu, 1988). Um volume de 2 mL de amostra (5mg/mL) foi adicionado em 2 mL de tampão fosfato 0,2 mol/L (pH 6,6) e 2 mL de ferricianeto de potássio 1%. A seguir a mistura foi incubada a 50 °C durante 20 min, e após adicionou-se na reação 2 mL de TCA 10%. Uma alíquota (2 mL) foi misturada com 2 mL de água destilada e 0,4 mL de cloreto férrico 0,1% em tubos de ensaio. Após 10 min de reação, a absorbância da solução resultante foi lida a 700 nm em espectrofotômetro UV/VIS (ATI UNICAM Helios, modelo Alfa, UK). Ácido ascórbico (AA) foi usado como padrão para a construção de uma

curva de calibração e o poder redutor foi expresso como μmol de AA/g de amostra.

9.2.8 Atividade Antioxidante dos hidrolisados protéicos em Carne Moída

A atividade antioxidante em carne bovina moída foi determinada conforme descrito por Sakanaka et al. (2005). Carne moída (5 g) foi homogeneizada em 25 mL de tampão HEPES 50mmol/L (pH 7,0). A mistura contendo 0,8 mL de suspensão de carne moída e 0,2 mL de tampão HEPES ou uma amostra de uma solução de hidrolisado (hidrolisado em tampão HEPES) nas concentrações finais de 2,5, 5, 10, 20 e 40 mg/mL foram incubadas a 37 °C por 60 min. Após a incubação, a mistura foi avaliada pela formação de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS). No dia do uso foi preparada uma solução estoque de ácido tricloroacético (TCA/TBA) consistindo de TCA 0,9 mol/L e TBA 0,03 mol/L em HCl 0,25 mol/l. Após leve aquecimento e agitação para dissolver os componentes, 3 mL de butil hidroxitolueno (BHT) 20 g/L em etanol absoluto foram adicionados para 100 mL de solução estoque de TCA/TBA. Em intervalos apropriados, alíquotas de 1,0 mL da mistura foram adicionadas em tubos de ensaio contendo 2 mL de solução estoque TCA/TBA e imediatamente misturadas em vórtex (Phoenix, AP-56, Brasil). As amostras foram então aquecidas até ebulição por 10 min em banho-maria, resfriadas à temperatura ambiente e centrifugadas a 1710 X g (Biosystems, modelo MPW-350/350R) por 10 min. A absorbância do sobrenadante foi medida a 532 nm. TBARS foram calculadas a partir da construção de uma curva padrão de malonaldeído utilizando tetrametoxipropano.

9.2.9 Composição de Aminoácidos dos hidrolisados

A determinação da composição de aminoácidos das amostras de hidrolisados músculo de pescado com Flavourzyme e de frango com α -Quimotripsina foram realizadas pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (UNESP, Ribeirão Preto, SP, Brasil). Os aminoácidos foram obtidos por hidrólise dos peptídeos com HCl 6 mol/L durante 22 h a 110 °C \pm 1 °C, conforme Spackman et al. (1958).

9.2.10 Análise Estatística

Todas as determinações foram realizadas em triplicata. Os dados para os diferentes parâmetros foram comparados através de análise de variância (ANOVA) com o auxílio do programa STATISTICA[®] versão 6.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, EUA). As diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os resultados foram identificadas usando teste de Tukey.

9.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

9.3.1 Hidrólise enzimática do músculo de peixe e frango

No presente estudo, proteínas musculares de peixe e de frango foram hidrolisadas separadamente com Flavourzyme e α -Quimotripsina para a produção de peptídeos antioxidantes. Os hidrolisados foram fracionados através de ultrafiltração por membranas. As três frações obtidas para cada hidrolisado produzido tiveram sua atividade antioxidante avaliada. A extensão da degradação das proteínas pelas enzimas proteolíticas foi estimada pela medida do grau de hidrólise (GH) onde foi observado para os hidrolisados de peixe valores de 25,9 e 27,6% e para os hidrolisados de frango, 17,8 e 20,6%, respectivamente para Flavourzyme e α -Quimotripsina. De acordo com Shahidi et al. (1994), o GH é um importante fator altamente relacionado com o rendimento do processo de hidrólise. Observou-se um aumento inicial rápido do GH, à medida que o tempo aumentava, indicando uma clivagem muito elevada das proteínas nas primeiras horas de reação. Em seguida houve uma estabilização das reações de hidrólise. Conforme Souissi et al. (2007), a diminuição ou estabilização na taxa de reação pode ser explicada pela inibição da enzima por produtos que são formados em valores elevados de GH. Esses produtos competem com o substrato causando indigestão ou digestão parcial das proteínas. A forma das curvas de hidrólise foi semelhante à relatada em estudos anteriores com salmão (Kristinsson e Rasco, 2000b), atum (Guérard et al., 2001), frango (Kurozawa et al., 2009) e tilápia (Foh et al., 2010). Com o mesmo substrato e a mesma quantidade de enzima, α -Quimotripsina mostrou maiores valores de GH para os hidrolisados de peixe e de frango que a Flavourzyme. Os níveis mais elevados de GH sugerem que α -Quimotripsina tem maior afinidade pelo substrato e, portanto é mais eficiente que a Flavourzyme para a produção de hidrolisados proteicos de músculo de peixe e de frango. Em geral proteases alcalinas, como α -Quimotripsina apresentam atividade mais elevada que proteases ácidas ou neutras (Rebeca, et al., 1991; Klompong et al., 2007).

9.3.2 Fracionamento dos hidrolisados por Ultrafiltração (UF)

O uso do sistema de ultrafiltração por membranas é apropriado para obter hidrolisados proteicos com faixas de peso molecular desejados (Jeon et al., 1999). Durante o processo de UF em dois estágios, três diferentes frações (F1000 Da, F1000-500 Da e F500 Da) foram obtidas usando membranas de “cut-off” de 1000 e 500 Da. Os valores das frações em termos de peso molecular, e seu impacto na população de peptídeos,

composição de aminoácidos e propriedades antioxidantes são discutidas a seguir. Os ultrafiltrados (F1000-500 Da e F500 Da) e o retentado (F1000 Da) se mostraram ricos em peptídeos com peso molecular conforme o “cut-off” prescrito pela membrana de ultrafiltração utilizada. Porém, pequena porcentagem de peptídeos acima ou abaixo do “cut-off” foram encontradas nas frações analisadas.

De acordo com Picot et al. (2010), as membranas não realizam separações com total eficiência, sendo que algumas classes de pesos moleculares podem ser encontradas em várias frações. Um fenômeno complicado devido a fatores físicos e químicos ocorre durante a filtração de soluções contendo proteínas e sólidos proteináceos, solúveis e insolúveis, o que causa uma polarização de concentração e incrustação/colmatação da membrana e conseqüentemente, um drástico declínio no fluxo. Devido a sua hidrofobicidade, interações entre proteínas e membranas podem ocorrer e são inerentes ao processo. Dependendo do tamanho da partícula, as proteínas podem entrar nos poros da membrana, ou permanecerem como uma camada em forma de gel na superfície formando um depósito, aumentando significativamente a resistência à filtração (Foh et al., 2010).

9.3.3 Distribuição do Peso Molecular

A cromatografia de filtração em gel, empregando sistema FPLC, foi usada para estudar os perfis de distribuição de peso molecular das frações dos hidrolisados protéicos de pescado (HPF e HPQ) e de frango (HFF e HFQ) obtidos através da ultrafiltração por membranas. A partir dos dados cromatográficos (Figuras 2 e 3), evidenciou-se uma redução de peptídeos de elevado peso molecular.

Considerando os hidrolisados integrais, antes do processo de ultrafiltração (dados não mostrados), observou-se que 60,8% do HPF e 50,9% do HPQ eram compostos de pequenos peptídeos, menores que 3 kDa. Valores semelhantes foram relatados por Ren et al. (2008), em hidrolisados de carpa prateada obtidos com pancreatina e Neutrase, mostrando que 69,3 e 64,7% dos peptídeos apresentavam peso molecular menor que 3 kDa, respectivamente. No entanto, para HFF e HFQ, 83 e 92,4% dos peptídeos apresentavam peso molecular menor que 3 kDa, respectivamente.

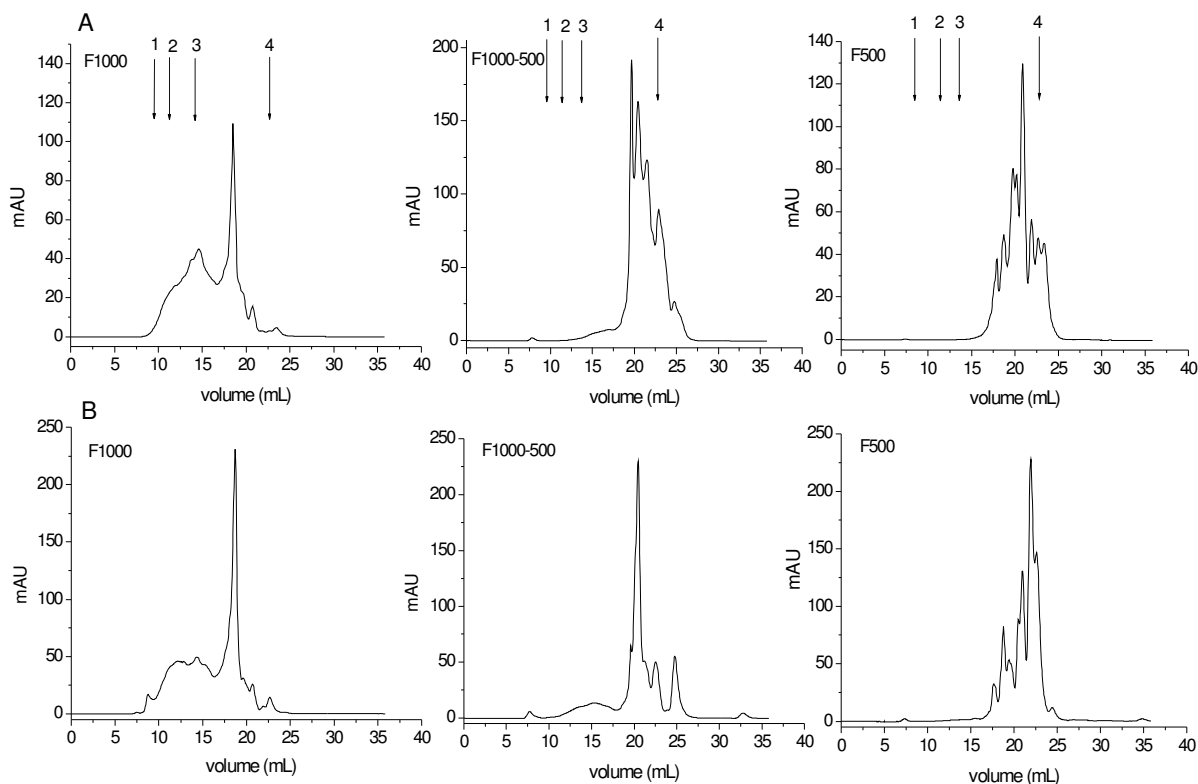


Figura 2. Perfil da distribuição de peso molecular das frações de hidrolisados de pescado (F1000, F100-500 e F500) com as enzimas (A) Flavourzyme e (B) α -Quimotripsina. 1, ribonuclease A (13700 Da); 2, aprotinina (6500 Da); 3, angiotensina I (1296 Da); 4, triptofano (204 Da).

Esses resultados também concordam com os resultados publicados por Chabeaud et al. (2009), os quais relatam que hidrolisados de *Pollachius virens*, uma espécie da família do bacalhau, produzidos com a enzima Alcalase, eram compostos de 90% de peptídeos menores que 3 kDa. Em geral, as frações peptídicas obtidas com músculo de frango (Figura 3) apresentaram maior porcentagem de peptídeos de baixo peso molecular em relação às frações peptídicas dos hidrolisados obtidos com músculo de pescado (Figura 2). Embora as proporções relativas dos picos tenham variado de acordo com a porosidade da membrana utilizada, as distribuições de peso molecular foram semelhantes ao comparar as frações obtidas com as mesmas enzimas, tanto para os peptídeos de pescado como para os peptídeos de frango. A partir desses resultados, verifica-se que os hidrolisados de músculo de pescado e de frango eram formados provavelmente por uma mistura de peptídeos de pequeno tamanho.

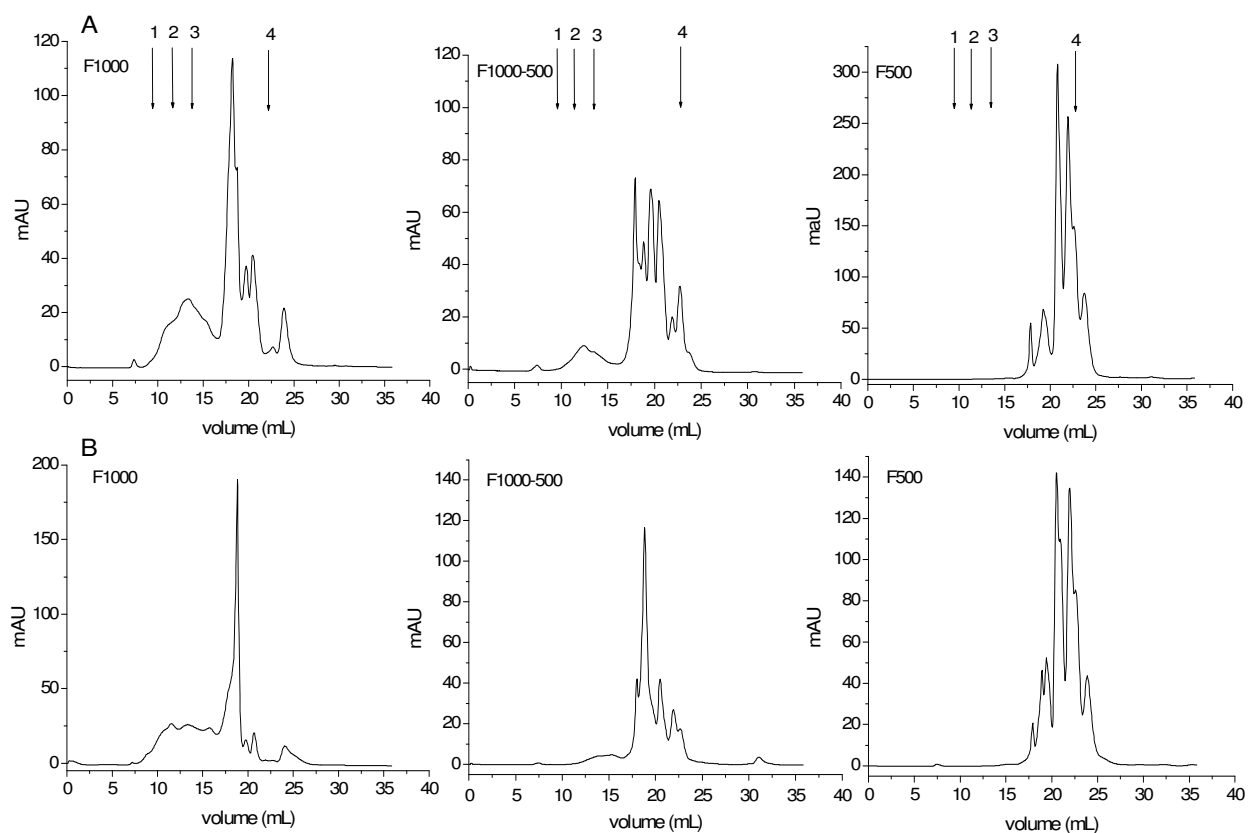


Figura 3. Perfil da distribuição de peso molecular das frações de hidrolisados de frango (F1000, F100-500 e F500) com as enzimas (A) Flavourzyme e (B) α -Quimotripsina. 1, ribonuclease A (13700 Da); 2, aprotinina (6500 Da); 3, angiotensina I (1296 Da); 4, triptofano (204 Da).

Todas as frações, tanto para os hidrolisados de pescado como para os hidrolisados de frango apresentaram elevadas concentrações de peptídeos (acima de 80%) dentro do “cut-off” da membrana utilizada, exceto a F1000, que reteve uma concentração de peptídeos com peso molecular menor que a porosidade da membrana, e isso provavelmente se deve à incrustação da mesma.

9.3.4 Eletroforese

Os hidrolisados também foram analisados através de eletroforese SDS-PAGE visando à determinação do perfil de peso molecular e também para confirmar que a hidrólise foi alcançada. Os perfis eletroforéticos mostraram que os tratamentos enzimáticos

foram eficazes na degradação tanto do músculo de peixe como do músculo frango, resultando em pequenos peptídeos como pode ser observado na Figura 4.

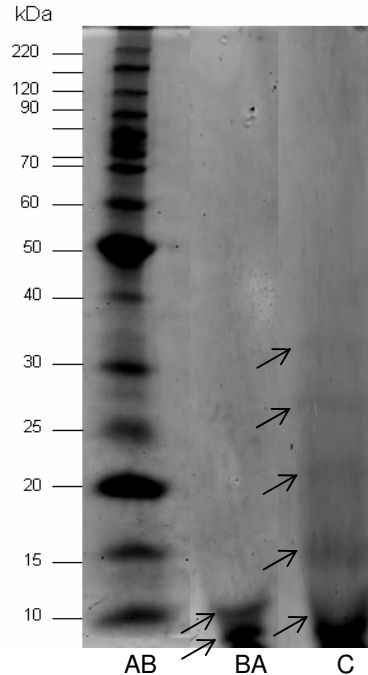


Figura 4. Perfil eletroforético dos hidrolisados: de peixe obtido com a enzima (B) Flavourzyme, de frango obtido com a enzima (C) α -Quimotripsina e (A) dos marcadores padrão de peso molecular.

Observou-se, após a hidrólise, a presença de duas bandas peptídicas, uma com peso molecular estimado em 10 kDa e a outra abaixo de 10 kDa, para o hidrolisado de músculo de peixe com a enzima Flavourzyme. Rossini et al. (2009) também observaram a presença de duas bandas peptídicas com pesos moleculares estimados em 9 e 14 kDa para peptídeos de caseína com atividade antioxidante produzidos com Flavourzyme. Cinco bandas peptídicas foram observadas para o hidrolisado de músculo frango com a enzima α -Quimotripsina. Quatro delas de maior peso molecular sendo estimadas na faixa de 35, 27,5 e 20 kDa e as demais bandas com peso molecular estimado em 15 kDa e menor que 10 kDa.

No estudo de Soussi et al. (2007), os perfis eletroforéticos de hidrolisados de *Sardinella aurita*, apresentaram uma banda com peso molecular menor que 14,2 kDa e duas bandas com pesos moleculares na faixa de 55 e 30 kDa. Segundo estes autores, isso pode ser resultado de proteínas maiores presentes na matéria-prima ou de proteínas que não foram totalmente hidrolisadas pela enzima.

Durante a hidrólise, a clivagem das proteínas envolve uma maior mudança estrutural, na qual a proteína é hidrolisada em pequenas unidades peptídicas (Kristinsson e Rasco, 2000a). Comparando os perfis eletroforéticos verificou-se que HPF (GH=25,9%)

apresentou bandas com pesos moleculares menores em relação ao HFQ (GH=20,6%), indicando que a enzima Flavourzyme pode favorecer a hidrólise das proteínas musculares.

9.3.5 Atividade Antioxidante das frações dos hidrolisados de músculo de peixe e frango

Embora existam vários métodos para avaliar a capacidade antioxidante em sistemas alimentícios, como os testados nesse trabalho, nenhum destes pode ser usado como um método padronizado oficial. Portanto, sugere-se que cada avaliação seja feita usando várias técnicas de medida, em diferentes meios e condições de oxidação (Frankel e Meyer, 2000). De modo geral, considerando os métodos de avaliação empregados, observou-se que todas as frações apresentaram capacidade antioxidante.

9.3.5.1 Capacidade de sequestro do radical hidroxila

A capacidade de sequestro do radical hidroxila foi investigada através do método da oxidação da 2-desoxirribose. A Figura 5 mostra o efeito sequestrante do radical hidroxila apresentado pelas frações dos hidrolisados de músculo de peixe e frango. As frações obtidas a partir dos hidrolisados de peixe se mostraram mais efetivas que as frações obtidas a partir dos hidrolisados de frango na capacidade de sequestro do radical hidroxila. F1000-500, obtida a partir do HPF atingiu 55,3% de inibição com 1 mg/mL (Figura 5A).

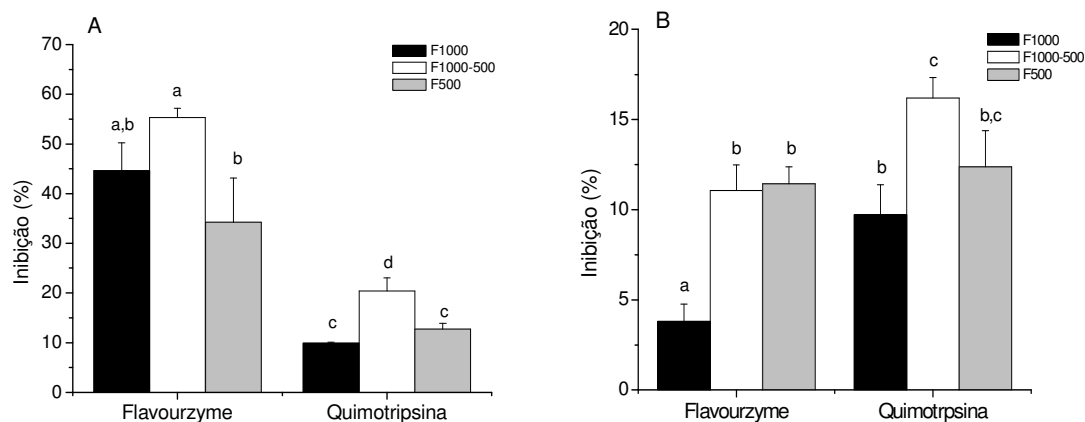


Figura 5. Atividade sequestradora do radical hidroxila das frações dos hidrolisados de (A) peixe e (B) frango. Valores correspondentes à média de três repetições \pm desvio padrão. Letras iguais, não há diferenças significativas ($p > 0,05$).

Entre as três frações obtidas para cada hidrolisado, a partir da ultrafiltração por membranas, a fração intermediária F1000-500 foi a que mostrou maior inibição, tanto para

os hidrolisados de pescado como para os hidrolisados de frango, exceto para F1000-500 do HFF (Figura 5B). Os hidrolisados de pescado obtidos com Flavourzyme foram mais eficientes na capacidade de sequestro do radical $\text{OH}\cdot$ que do que os obtidos com α -Quimotripsina (Figura 5A). Já para os hidrolisados de frango o comportamento foi diferente e contrário onde a α -Quimotripsina produziu frações com poder antioxidante mais eficiente.

9.3.5.2 Capacidade de sequestro do radical DPPH

A Figura 6 mostra a capacidade de sequestro do radical DPPH dos hidrolisados fracionados. A fração F1000, tanto para os hidrolisados de pescado como para os hidrolisados de frango, produzidos com Flavourzyme e α -Quimotripsina, mostrou maior capacidade de sequestro do radical DPPH na maioria das concentrações testadas. Os valores de EC_{50} , capaz de inibir 50% da oxidação, foram 2,1 e 1,4 mg/mL para F1000 dos HPF e HPQ, respectivamente (Figura 6A). Para F1000 dos HFF e HFQ, os valores de EC_{50} foram 2,9 e 1,9 mg/mL respectivamente (Figura 6B).

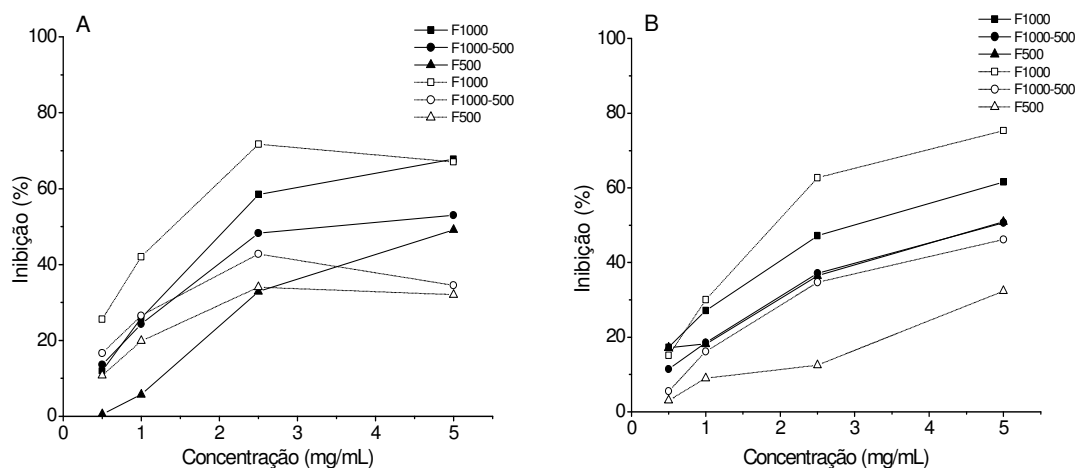


Figura 6. Atividade de sequestro do radical DPPH das frações dos hidrolisados de (A) pescado e (B) frango. (—) Flavourzyme; (---) Quimotripsina. Valores correspondentes à média de três repetições.

Observou-se ainda que a capacidade de sequestrar os radicais DPPH apresentada pelas frações do HFF, HFQ e HPF foi dose-dependente, concordando com resultados apresentados por Je et al. (2007). Essa tendência não foi observada nas frações obtidas a partir dos HPQ, ou seja, quando se aumentaram as concentrações de amostra acima de 2,5 mg/mL o poder de inibição não aumentou, pois em maiores concentrações os hidrolisados podem ter causado efeito pró-oxidante.

9.3.5.3 Capacidade de sequestro do radical livre ABTS

O método da captura do radical ABTS é amplamente utilizado para verificar a atividade antioxidante e é relatado como um ensaio de descoloração aplicável para ambos compostos hidrofílicos e lipofílicos, dessa forma uma redução na cor indica redução do radical ABTS (Miliauskas et al., 2004). A Figura 7 mostra a capacidade e sequestro do radical ABTS dos hidrolisados fracionados. A fração F1000, tanto para HPF como para HFF, mostrou maior capacidade de sequestro do radical ABTS, enquanto que para HPQ e HFQ o maior potencial antioxidante foi exibido pela F1000-500. Segundo Phanturat et al. (2010), peptídeos produzidos a partir de hidrólise com diferentes enzimas podem variar em relação à capacidade de captura do radical livre ABTS. Estes autores também verificaram que a capacidade de sequestro do radical livre ABTS dos hidrolisados de *Priacanthus macracanthus* foi maior na fração que continha peptídeos com peso molecular de 1700 Da.

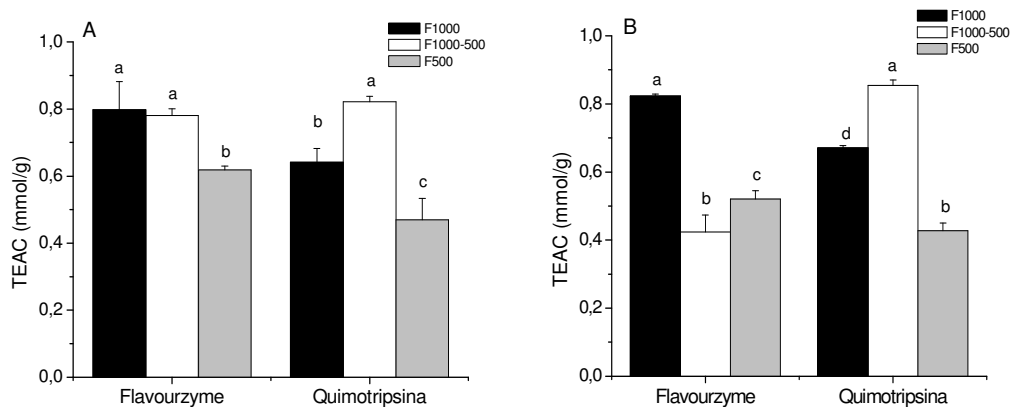


Figura 7. Atividade de sequestro do radical ABTS das frações dos hidrolisados de (A) pescado e (B) frango. Valores correspondentes à média de três repetições \pm desvio padrão. Letras iguais, não há diferenças significativas ($p > 0,05$).

9.3.5.4 Poder Redutor

O poder redutor é o método mais eficaz de avaliar a capacidade de um antioxidante doar elétrons (Kong e Xiong, 2006). A Figura 8 representa o poder redutor das frações dos hidrolisados de pescado e frango. Todas as frações dos hidrolisados apresentaram alguma atividade antioxidante, ou seja, alguma capacidade de doar elétrons. Quando se compara o poder redutor em relação ao substrato empregado no processo de hidrólise, as frações dos hidrolisados preparados com músculo de pescado mostraram maior potencial redutor que as frações dos hidrolisados preparados com músculo de frango. Isso se deve provavelmente aos maiores valores de GH exibidos pelos hidrolisados de pescado (25,9 e 27,6%, para HPF e HPQ respectivamente), ou ainda devido ao aumento da disponibilidade

de íons hidrogênio produzidos durante a hidrólise protéica (Kong e Xiong, 2006).

Diante disso podemos dizer que F1000 obtida a partir de HPF e HFF foi a fração que mais contribuiu para a atividade desses hidrolisados. Por outro lado F1000-500 foi a fração que mostrou maior contribuição na atividade antioxidante dos hidrolisados produzidos com α -Quimotripsina, seguindo a mesma tendência que a atividade antioxidante medida com o ensaio do radical ABTS.

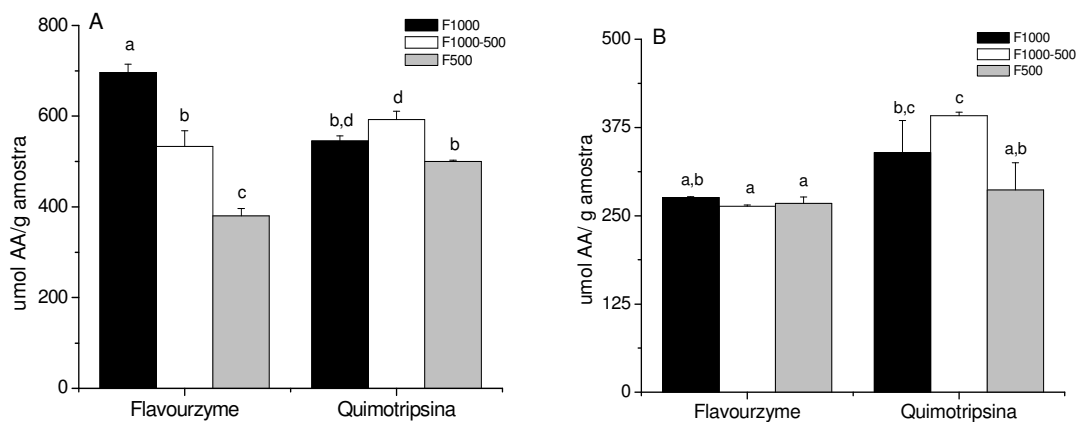


Figura 8. Poder redutor das frações dos hidrolisados de (A) pescado e (B) frango. Valores correspondentes à média de três repetições \pm desvio padrão. Letras iguais, não há diferenças significativas ($p > 0,05$).

Neste estudo, foi observada forte atividade antioxidante em F1000 e F1000-500 Da. Em geral, para as frações obtidas a partir dos hidrolisados de pescado, foram observados valores mais elevados de atividade antioxidante para a enzima Flavourzyme. No entanto, para as frações obtidas a partir dos hidrolisados de frango, melhores resultados foram apresentados pela enzima α -Quimotripsina. Estas observações parecem estar de acordo com os resultados encontrados para os hidrolisados integrais. De acordo com Kitts (2005), pequenos peptídeos são frequentemente relacionados com a atividade antioxidante, no entanto os resultados obtidos não concordam com esse autor. Porém, Wu et al. (2003) relataram que hidrolisados de cavala (*Scomber austriasicus*), com peso molecular de aproximadamente 1400 Da, apresentaram maior atividade antioxidante *in vitro*, contra a peroxidação lipídica, capacidade de sequestro do radical DPPH e poder redutor, que peptídeos com pesos moleculares na faixa de 900-200 Da.

Je et al. (2005a) produziram hidrolisados de ossos de merluza e verificaram que a fração com peso molecular na faixa de 1000-3000 Da, obtida após ultrafiltração por membranas, apresentou o maior potencial antioxidante. Esses resultados sugerem que a atividade antioxidante das proteínas ou dos peptídeos depende, além do seu peso

molecular, da natureza e composição e das diferentes frações peptídicas produzidas, de propriedades como hidrofobicidade, habilidade de transferir elétrons dos resíduos de aminoácidos na seqüência e das condições de hidrólise (Qian et al., 2008; Chabeaud et al., 2009). Pihlanto (2006) sugere que a detecção da atividade antioxidante usando ensaios *in vitro* baseia-se em diferentes mecanismos antioxidantes e reflete as propriedades multifuncionais dos peptídeos. No entanto, nem a relação estrutura-atividade, nem o mecanismo antioxidante são ainda totalmente compreendidos.

9.3.6 Atividade Antioxidante em Carne Moída

A partir de HPF e HFQ, os quais mostraram boas respostas para a atividade antioxidante *in vitro* suas atividades foram testadas em um sistema modelo de carne bovina moída. Os hidrolisados foram adicionados à carne moída homogeneizada em diferentes concentrações, e a oxidação lipídica foi avaliada. A reação foi medida pelo monitoramento das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e os resultados estão representados na Figura 9.

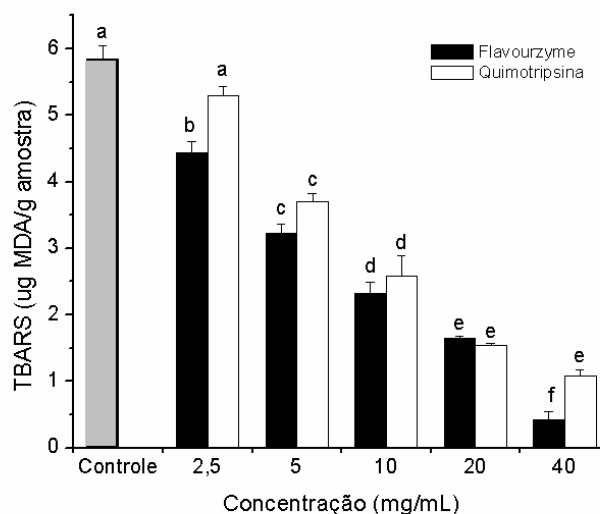


Figura 9. Efeito aos hidrolisados de pescado (HPF) e trango (HFQ) na formação de TBARS em carne moída bovina. Valores correspondentes à média de três repetições \pm desvio padrão. Letras iguais, não há diferenças significativas ($p > 0,05$).

Segundo Lee e Hendricks (1997), a carne moída homogeneizada pode ser um meio eficaz para investigar os efeitos protetores de antioxidantes solúveis em água contra a peroxidação lipídica. Quando incorporados à carne moída, HPF e HFQ inibiram respectivamente, 72 e 73,8% da oxidação lipídica adicionados na concentração de 20 mg/mL. Quando se adicionaram 40mg/mL de HPF e HFQ, 93 e 80% da oxidação lipídica foi

inibida, respectivamente. Evidenciou-se que o hidrolisado produzido com a enzima Flavourzyme foi mais eficiente na inibição da oxidação e dessa forma, pode ser usado como potente antioxidante natural em sistemas cárneos e que Sakanaka et al. (2005) obtiveram 69,7% de inibição da oxidação em carne moída com peptídeos de caseinato de cálcio (obtidos por hidrólise com enzima microbiana da caseinato de cálcio) empregando 20 mg/mL. Já Rossini et al. (2009), obtiveram 100% de inibição da oxidação utilizando 20 mg/mL de peptídeos de caseína obtidos com Flavourzyme. Lee e Hendricks (1997) alcançaram 76,2% de inibição utilizando 20 mmol/L de carnosina (um dipeptídeo endógeno encontrado no músculo esquelético da maioria dos vertebrados).

9.3.7 Composição de Aminoácidos

A composição de aminoácidos dos hidrolisados de músculo de pescado com Flavourzyme (HPF) e de músculo de frango com α -Quimotripsina (HFQ) está apresentada na Tabela 1.

Verificou-se que 34,0% e 32,9% dos aminoácidos presentes em HPF e HFQ eram compostos de aminoácidos hidrofóbicos, respectivamente. Para hidrolisados de proteínas e peptídeos, quanto maior a hidrofobicidade maior será sua solubilidade em lipídios e, portanto, sua atividade antioxidante aumenta (Rajapakse et al., 2005).

Maior quantidade de histidina foi observada em HFQ, a qual tem habilidade de sequestrar o radical lipídico pelo anel imidazol, de acordo com Je et al. (2005c). No entanto, a quantidade de aminoácidos contendo resíduos sulfúricos (cisteína e metionina) foi maior para HPF do que para HFQ, o que pode ter contribuído mais intensamente para a atividade antioxidante mais elevada desse hidrolisado, juntamente com o maior conteúdo de aminoácidos hidrofóbicos, especialmente Leucina, Alanina, Valina e Isoleucina.

Tabela 1. Composição de aminoácidos dos hidrolisados de músculo de peixe com Flavourzyme (HPF) e de músculo de frango com α -Quimotripsina (HFQ) (mg aminoácido /g proteína).

Aminoácido	HPF ^a	HFQ ^a
Ácido aspártico	91,9 ± 2,6	82,8 ± 0,6
Treonina	43,5 ± 2,6	40,6 ± 0,2
Serina	45,3 ± 1,2	41,7 ± 3,6
Ácido glutâmico	167,8 ± 0,8	162,3 ± 2,5
Glicina	48,8 ± 0,5	33,9 ± 0,1
Alanina	63,3 ± 0,1	52,3 ± 0,3
Valina	50,6 ± 1,1	47,0 ± 3,0
1/2 Cisteína	4,6 ± 0,1	3,3 ± 0,3
Metionina	35,7 ± 1,7	31,1 ± 3,3
Isoleucina	45,6 ± 1,5	45,2 ± 0,7
Leucina	85,1 ± 3,2	83,1 ± 1,2
Tirosina	19,8 ± 1,4	29,5 ± 3,7
Fenilalanina	40,4 ± 0,3	40,9 ± 0,7
Lisina	100,2 ± 1,4	105,9 ± 3,5
Histidina	24,5 ± 0,6	61,7 ± 0,7
Triptofano	^b	^b
Arginina	47,3 ± 0,7	71,48 ± 1,0
Prolina	85,7 ± 1,4	64,27 ± 0,6

^a Composição de aminoácidos dos hidrolisados integrais após hidrólise com HCl 6 mol/L.

^b não determinado.

Resultados semelhantes foram observados no estudo de Rossini et al. (2009) para hidrolisados de caseína com Flavourzyme onde a quantidade de aminoácidos hidrofóbicos foi 35,6% (sem considerar Triptofano). Dong et al. (2008) encontraram 39,1% e 40,8% de aminoácidos hidrofóbicos em hidrolisados protéicos de músculo de carpa prateada (*Hypophthalmichthys molitrix*) com Flavourzyme para 1,5 e 4 h de hidrólise, respectivamente.

9.4 CONCLUSÃO

Hidrolisados protéicos de músculo de peixe e frango foram preparados por hidrólise enzimática utilizando as enzimas Flavourzyme e α -Quimotripsina e posteriormente, foram separados através da técnica de ultrafiltração por membranas e avaliados em relação à sua atividade antioxidante através de diferentes ensaios *in vitro* incluindo, capacidade de sequestro dos radicais livres, DPPH e ABTS, radical hidroxila e poder redutor. As diferentes frações obtidas exibiram apreciáveis níveis de atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres. Os resultados revelaram que a fração do hidrolisado de peixe obtido com a enzima Flavourzyme, com peso molecular maior que 1000 Da, foi a que apresentou a maior atividade antioxidante. HPF apresentou maior conteúdo de aminoácidos hidrofóbicos e aminoácidos sulfurados, o que levou a uma maior inibição da oxidação lipídica quando empregado em um sistema cárneo.

9.5 AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pela CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e desenvolvido no Instituto de Investigação das Pescas e do Mar (INBR/IPIMAR) em Lisboa-PT, através de bolsa de estudos concedida ao primeiro autor pelo Programa de Doutorando no Brasil com Estágio no Exterior – PDEE (processo n° 0076/10-4). Os autores agradecem ainda o Projeto Chill-On (FP 6- 409 016333-2) e o CNPq (Concessão 305055/2006-2).

9.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER-NISSEN J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 27, n. 6, p. 1256-1262, 1979.

AEWSIRI, T.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; WIERENGA, P. A.; GRUPPEN, H. Antioxidative activity and emulsifying properties of cuttlefish skin gelatin–tannic acid complex as influenced by types of interaction. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 11, p. 712-720, 2010.

BOUGATEF, A.; NEDJAR-ARROUME, N.; MANNI, L.; RAVALLEC, R.; BARKIA, A.; GUILLOCHON, D.; NASRI, M. Purification and identification of novel antioxidant peptides

from enzymatic hydrolysates of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products proteins. **Food Chemistry**, v. 118, p. 559-565, 2010.

CENTENARO, G. S.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C.; SALAS-MELLADO, M. Hidrolisado protéico de pescado obtido por vias química e enzimática a partir de corvina (*Micropogonias furnieri*). **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1792-1798, 2009.

CHABEAUD, A.; DUTOURNIÉ, P.; GUÉRARD, F.; VANDANJON, L.; BOURSEAU, P. Application of response surface methodology to optimise the antioxidant activity of a saithe (*Pollachius virens*) hydrolysate. **Marine Biotechnology**, v. 11, p. 445-455, 2009.

CHUNG, S. K.; OSAWA, T.; KAWAKISHI, S. Hydroxyl radical scavenging effect of spices and scavengers from Brown Mustard (*Brassica nigra*). **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 61, p.118-24, 1997.

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

EKANAYAKE, P.; LEE, Y. D.; LEE, J. Antioxidant activity of flesh and skin of *Eptatretus burgeri* (hag fish) and *Enedrias nebulosus* (white spotted eel) **Food Science and Technology International**, v. 10, n. 3, p. 0171–0177, 2004.

FOH, M. B. K.; QIXING, J.; AMADOU, J.; XIA, W.S. Influence of ultrafiltration on antioxidant activity of tilapia (*Oreochromis niloticus*) protein hydrolysate. **Advance Journal of Food Science and Technology**, v.2, n. 5, p. 227-235, 2010.

FONTANA, A.; CENTENARO, G. S.; PALEZI, S. C.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Obtenção e avaliação de concentrados protéicos de corvina (*Micropogonias furnieri*) processados por extração química. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 61-66, 2009.

FRANKEL, E. N.; MEYER, A. S. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 1925-1941, 2000.

GAUTHIER, S. F.; POULIOT, Y; SAINT-SAUVEUR, D. Immunomodulatory peptides

obtained by the enzymatic hydrolysis of whey proteins. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 1315-1323, 2006.

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

GUÉRARD, F.; SELLOS, D.; LE GAL, Y. Fish and shellfish upgrading, traceability. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 96, p. 127-163, 2005.

GULCIN, I.; BUYUKOKUROGLU, M. E.; OKTAY, M.; KUFREVIOGLU, O. I. Antioxidant and analgesic activities of turpentine of *Pinus nigra* Arn. subsp. *Pallsiana* (Lamb). Holmboe. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 86, p. 51-58, 2003.

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

JE, J-Y.; KIM, S-Y.; KIM, S-K. Preparation and antioxidative activity of hoki frame protein hydrolysate using ultrafiltration membranes. **European Food Research Technology**, v. 221, p. 157-162, 2005a.

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

JEON, Y. J.; BYUN, H. G. KIM, S. K. Improvement of functional properties of cod frame protein hydrolysates using ultrafiltration membranes. **Process Biochemistry**, v. 35 p. 471-478, 1999.

JIA, J.; MAA, H.; ZHAO, W.; WANG, Z.; TIAN, W.; LUO, L.; HE, R. The use of ultrasound for enzymatic preparation of ACE-inhibitory peptides from wheat germ protein. **Food Chemistry**, v. 119, p. 336-342, 2010.

KITTS, D. D. Antioxidant properties of caseinphosphopeptides. **Trends in Food Science and Technology**, v. 16, p. 549-554, 2005.

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

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

KRISTINSSON, H. G.; RASCO, B. A. Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical and Functional Properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 40, n.1, p. 43-81, 2000a.

KRISTINSSON, H. G.; RASCO, B. A. Biochemical and functional properties of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle hydrolyzed with various alkaline proteases. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 48, p. 657-666, 2000b.

KUROZAWA, L. E.; PARK, K. J.; HUBINGER, M. D. Influência das condições de processo na cinética de hidrólise enzimática de carne de frango. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 3, p. 557-566, 2009.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LEE, B. J.; HENDRICKS, D. G. Antioxidant effects of L-carnosine on liposomes and beef homogenates. **Journal Food Science**, v. 62, p. 931-934, 1997.

MAILLARD, M. N.; SOUM, M. H.; MEYDANI, S. N.; BERSSET, C. Antioxidant activity of barley and malt: Relationship with phenolic content. **Food Science and Technology**, v. 29, p. 238-244, 1996.

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

McCANN K. B.; SHIELL, B. J.; MICHALSKI, W. P.; LEE, A.; WAN, J.; ROGINSKI, H.;

COVENTRY, M. J. Isolation and characterisation of a novel antibacterial peptide from bovine α_{S1} -casein. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 316-323, 2006.

MEISEL, H.; FITZGERALD, R. J. Biofunctional peptides from milk proteins: mineral binding and cytomodulatory effects. **Current Pharmaceutical Design**, v. 9, p. 1289–1295, 2003.

MENDIS, E., RAJAPAKSE, N., KIM, S. K. Antioxidant properties of radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 581-587, 2005.

MILIAUSKAS, G.; VENSKUTONISA, P. R.; VAN BEEKB, T. A. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. **Food Chemistry**, v. 85, p. 231-237, 2004.

OYAIZU, M. Antioxidative activities of browning products of glucosamine fractionated by organic solvent and thin-layer chromatography. **Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi**, v. 35, p. 771-775, 1988.

PARK, P. J.; JUNG, W. K.; NAM, K. S.; SHAHIDI, F.; KIM, S. K. Purification and characterization of antioxidative peptides from protein hydrolysate of lecithin-free egg yolk. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 78, p.651-656, 2001.

PHANTURAT, P.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; SITTIRUK ROYTRAKUL. Use of pyloric caeca extract from bigeye snapper (*Priacanthus macracanthus*) for the production of gelatin hydrolysate with antioxidative activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, p. 86-97, 2010.

PICOT, L.; RAVALLEC, R.; FOUCHEREAU-PÉRON, M.; VANDANJON, L.; JAOUEN, P.; CHAPLAIN-DEROUINIOT, M.; GUÉRARD, F.; CHABEAUD, A.; LEGAL, Y.; ALVAREZ, O. M.; BERGÉ, J-P.; PIOT, J-M.; BATISTA, I.; PIRES, C.; THORKELSSON, G.; DELANNOY, C.; JAKOBSEN, G.; JOHANSSONM, I.; BOURSEAUD, P. Impact of ultrafiltration and nanofiltration of an industrial fish protein hydrolysate on its bioactive properties. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, p. 1819–1826, 2010.

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

PIRES, C.; BATISTA, I.; GODINHO, V.; NUNES, M. L. Functional and biochemical characterization of proteins remaining in solution after isoelectric precipitation. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 17, n.1, p. 60-72, 2008.

QIAN, Z-J.; JUNG, W-K.; KIM, S-K. Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, *Rana catesbeiana Shaw*. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 1690-1698, 2008.

RAJAPAKSE, N.; MENDIS, E.; BYUN, H. G.; KIM, S. K. Purification and in vitro antioxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative systems. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 16, p. 562-569, 2005.

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 Biology and Medicine**, v. 26, p. 1231-1237, 1999.

REBECA, B. D.; PENA-VERA, M. T.; DIAZ-CASTANEDA, M. Production of fish protein hydrolysates with bacterial proteases, yield and nutritional value. **Journal of Food Science**, v. 56, p. 309-314, 1991.

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

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

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

SALAS-MELLADO, M.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C.; MORAES, K. S.; ZAVAREZE, E. R. Produção de hidrolisado de cabrinha (*Prionotus punctatus*) e o efeito na composição química e características tecnológicas de pão. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 13, n.

3, p. 349-353, 2007.

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

SPACKMAN, D. H.; STEIN, W. H.; MOORE, S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. **Analytical Chemistry**, v. 30, p. 1190-1206, 1958.

SHAHIDI, F. Seafood Processing Byproducts. In: Shahidi, F. and J.R. Botta (Eds.), **Seafoods: Chemistry, Processing Technology and Quality**, 1st Edn., Blackie, London, U.K., p. 321-324, 1994.

SHIH, F. F.; DAIGLE, K. W. Antioxidant properties of milled-rice co-products and their effects on lipid oxidation in ground beef. **Journal of Food Science**, v. 68, p. 2672-2675, 2003.

SHIMADA, K., FUJIKAWA, K., YAHARA, K. AND NAKAMURA, T. Antioxidative properties of xanthan on the antioxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, v. 40, n. 6, p. 945-948, 1992.

SHIMIZU, M.; SAWASHITA, N.; MORIMATSU, F.; ICHIKAWA, J.; TAGUCHI, Y.; IJIRI, Y.; YAMAMOTO, J. Antithrombotic papain-hydrolyzed peptides isolated from pork meat. **Thrombosis Research**, v. 123, n. 5, p. 753-757, 2008.

SOUISSI, N.; BOUGATEF, A.; TRIKI-ELLOUZ, Y.; NASRI, M. Biochemical and functional properties of sardinella (*Sardinella aurita*) by-product hydrolysates. **Food Technology and Biotechnology**, v. 45, n. 2, p. 187-194, 2007.

SUN. J.; HE, H.; XIE, B. J. Novel antioxidant peptides from fermented mushroom *Ganoderma lucidum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 6646-6652, 2004.

WU, H. C.; CHEN, H. M.; SHIAU, C. Y. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). **Food Research International**, v. 36, p. 949-957, 2003.

WU, H. C.; SUN, P. B.; CHANG, C. L.; SHIAU; C. Y. Low-molecular-weight Peptides as Related to Antioxidant Properties of Chicken Essence. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 13, n. 2, p. 176-183, 2005.

ZHONG, F.; LIU, J.; MA, J.; SHOEMAKER, C. F. Preparation of hypocholesterol peptides from soy protein and their hypocholesterolemic effect in mice. **Food Research International**, v. 40, p. 661-667, 2007.

10 CONCLUSÕES GERAIS

Foi possível obter peptídeos antioxidantes através da hidrólise enzimática de proteínas de músculo e ossos de pescado e de frango utilizando as enzimas Flavourzyme, α -Quimotripsina e Tripsina.

O processo de desmineralização, anterior ao processo de hidrólise, dos ossos de pescado e frango mostrou melhor rendimento empregando solução de HCl 1,0 M durante 48 h de extração com pequena perda de colágeno.

Em relação aos hidrolisados enzimáticos de ossos de pescado e frango, observou-se que a atividade antioxidante dos peptídeos diferiu com o tipo de enzima utilizada, com o grau de hidrólise e com o tipo de sistema em que os antioxidantes são testados. Esses mesmos hidrolisados apresentaram diferença na distribuição do peso molecular resultando em diferentes comportamentos de atividade antioxidantes.

Os hidrolisados enzimáticos obtidos com a enzima Flavourzyme apresentaram elevada atividade de inibição da peroxidação lipídica sendo mais eficaz na produção de hidrolisados antioxidantes que α -Quimotripsina e Tripsina, no entanto, maior proporção de peptídeos de baixo peso molecular, para ossos de pescado e frango, foi observada nos hidrolisados com α -Quimotripsina. O GH não se mostrou inteiramente relacionado com a distribuição de peso molecular dos hidrolisados. Os hidrolisados de ossos de pescado apresentaram cor creme, levemente mais amarelada que os hidrolisados de ossos de frango.

Em relação aos hidrolisados enzimáticos de músculo de pescado e frango a atividade antioxidante, nos sistemas testados *in vitro*, indicou que os peptídeos musculares dessas duas matérias-primas são potentes sequestradores de radicais livres e capazes de inibir a oxidação lipídica.

Os hidrolisados enzimáticos preparados a partir de músculo de pescado apresentaram cor amarelada, e os hidrolisados de músculo de frango cor branca. Os hidrolisados com maiores valores de GH também mostraram melhor capacidade antioxidativa. O hidrolisado de músculo de pescado produzido com a enzima Flavourzyme foi mais efetivo como antioxidante e apresentou maior quantidade de grupos SH, os quais são eficientes sequestradores de radicais livres.

Entre os hidrolisados enzimáticos de músculo de pescado e frango separados por ultrafiltração por membranas verificou-se que a fração com peso molecular de 1000 Da do hidrolisado de pescado obtido com a enzima Flavourzyme foi a que apresentou a maior atividade antioxidante. Esse mesmo hidrolisado, quando incorporado a um sistema alimentício apresentou 93% de inibição da oxidação lipídica e pode ser usado como potente antioxidante natural em sistemas cárneos, devido principalmente ao maior conteúdo de

aminoácidos hidrofóbicos em sua composição.

Através da determinação da composição de aminoácidos foi possível verificar que HPF apresentou maior conteúdo de aminoácidos hidrofóbicos e aminoácidos contendo resíduos sulfúricos (cisteína e metionina), fazendo com que esse hidrolisado mostrasse maior potencial antioxidante.

Em comparação com os hidrolisados de ossos, os hidrolisados de músculo apresentaram, em geral, maior potencial antioxidante com destaque para HPF.

11 CONTRIBUIÇÕES E PERSPECTIVAS

Este trabalho traz como principal contribuição, a avaliação da atividade antioxidante de peptídeos obtidos através da hidrólise enzimática de músculo e de ossos de pescado e de frango com três enzimas: Flavourzyme, α -Quimotripsina e Tripsina.

Com a comprovação da atividade biológica dos hidrolisados em sistemas *in vitro* este trabalho abre caminho para sua aplicação em testes com alimentos e animais, como agente antioxidante. Para isto, é necessária ainda a realização de estudos complementares, tais como:

- Utilização de técnicas de purificação e identificação da seqüência peptídica da fração de maior atividade, bem como, a investigação de seus mecanismos de ação;
- Pesquisas sobre possíveis efeitos secundários que possam ocorrer nos alimentos, provocados pelos hidrolisados enzimáticos;
- Avaliação da atividade antioxidante a longo prazo para verificação da estabilidade de armazenamento;
- Avaliação da estabilidade da atividade biológica do hidrolisado, na presença de sistemas contendo carboidratos e lipídeos;
- Desenvolvimento de alimentos funcionais, com características sensoriais adequadas, contendo o hidrolisado antioxidante;
- Avaliação da eficácia do hidrolisado antioxidante em estudos com ratos.

12 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIA - **Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação** - Compêndio da Legislação de Alimentos: Consolidação das Normas e Padrões de Alimentos, 7ª ed., São Paulo, v.1, 1999.

ADLER-NISSEN J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 27, 1256-1262, 1979.

AEWSIRI, T.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; WIERENGA, P. A.; GRUPPEN, H. Antioxidative activity and emulsifying properties of cuttlefish skin gelatin–tannic acid complex as influenced by types of interaction. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 11, p. 712-720, 2010.

ALEMÁN, A.; GIMÉNEZ, B.; MONTERO, P.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. Antioxidant activity of several marine skin gelatins. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, p. 407-413, 2011.

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.

AOAC - **Association of Official Analytical Chemists. Official Methods Analysis of AOAC International**, Arlington, VA (USA), 1995. 16th ed.

BAILEY, A. E.; **Bailey's Industrial Oil and Fat Products**, 5ª ed., John Wiley: New York, v. 3, 1996.

BALLÈVRE, O. Protein hydrolysate vs free amino acid-based diets on the nutritional recovery of the starved rat. **European Journal of Nutrition**, v. 39, n. 6, p. 237-243, 2000.

BARBUT, S. **Poultry products processing: an industry guide**. Ed. CRC Press, Florida, USA, 2002.

BARRETO, S. L. T.; FERREIRA, W. M.; GONÇALVES, T. M. Níveis de proteína e de

vitamina E para matrizes de frango de corte. 2. Efeito sobre a concentração de α -tocoferol na gema e nos tecidos e balanço de nitrogênio. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n. 2, 1999.

BATISTA, I.; RAMOS, C.; COUTINHO, J.; BANDARRA, N. M.; NUNES, M. L. Characterization of protein hydrolysates and lipids obtained from black scabbardfish (*Aphanopus carbo*) by-products and antioxidative activity of the hydrolysates produced. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 18-24, 2010.

BELITZ, H. D.; GROSCH, W. **Química de los alimentos**. 2ª ed., Editora Acribia, Zaragoza, España, 1997.

BELLO, J. Los alimentos funcionales o nutraceuticos. I Nueva gama de productos en la industria alimentaria. **Alimentaria**, v. 32, n. 265, p. 25-30, 1995.

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

BENJAKUL, S.; MORRISSEY, M. Protein hydrolysates from Pacific whiting solid wastes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 9, p. 3423-3430, 1997.

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

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Introdução à química de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Varela, 2003. 238p.

BONIFER, L. B.; FRONING, G. W. Chicken skin composition as affected by aqueous washing. **Journal of Food Science**, v. 61, n. 5, p. 895-898, 1996.

BOTTERWECK, A. A. M.; VERHAGEN, H.; GOLDBOEHM, R. A.; KLEINJANS J.; VAN DEN BRANDT, P. A. Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: results from analyses in the Netherlands cohort study. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, n. 7, p.599-605, 2000.

BOUGATEF, A.; NEDJAR-ARROUME, N.; MANNI, L.; RAVALLEC, R.; BARKIA, A.;

GUILLOCHON, D.; NASRI, M. Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products proteins. **Food Chemistry**, v. 118, p. 559-565, 2010.

BOZA, J. J.; MOËNNOZ, D.; VUICHOUD, J.; JARRET, A. R.; GAUDARD-DE-WECK, D.; BALLEVRE, O. Protein hydrolysate vs free amino acid-based diets on the nutritional recovery of the starved rat. **European Journal of Nutrition**, v. 39, n. 6, p. 237-243, 2000.

BRASIL. **Ministério da Agricultura e do Abastecimento**. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Peixe Fresco. Portaria nº 185 de 13 de maio de 1997. Disponível em: <<http://www.engetecno.com.br>>. Acesso em: 08 de março de 2009.

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 1.004 de 11 de dezembro de 1998: Atribuição de função de aditivos, aditivos e seus limites máximos de uso para a categoria 8. Carne e produtos cárneos. Brasília, 1998. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/legis/index>>. Acesso em: 21 de dezembro de 2010.

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

CÂNDIDO, L. M. B.; SGARBIERI, V. C. Enzymatic hydrolysis of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) myofibrillar proteins: effects on nutritional and hydrophilic properties. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 83, p. 937-944, 2003.

CARIÉ, M. D.; MILANOVIÉ, S. D.; KRISTIÉ, D. M.; TEKIÉ, M. N. Fouling of inorganic membranes by adsorption of whey proteins. **Journal of Membrane Science**, v. 165, n. 5, p. 83-88, 2000.

CENTENARO, G. S.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C.; SALAS-MELLADO, M. Hidrolisado protéico de pescado obtido por vias química e enzimática a partir de corvina (*Micropogonias furnieri*). **Quimica Nova**, v. 32, n. 7, p. 1792-1798, 2009.

CHABANCE, B.; MARTEAU, P.; RAMBAUD, J. C.; MIGLIORE-SAMOUR, D.; BOYNARD, M.; PERROTIN, P.; GUILLET, R.; JOLLÈS, P.; FIAT, A. M. Casein peptide release and passage to the blood in humans during digestion of milk or yogurt. **Biochimie**, v. 80, n. 2, p.

155-165, 1998.

CHABEAUD, A.; DUTOURNIÉ, P.; GUÉRARD, F.; VANDANJON, L.; BOURSEAU, P. Application of response surface methodology to optimise the antioxidant activity of a saithe (*Pollachius virens*) hydrolysate. **Marine Biotechnology**, v. 11, p. 445-455, 2009.

CHEN, H-M.; MURAMOTO, K.; YAMAUCHI, F.; NOKIHARA, K. Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soyabean protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 2619-2623, 1996.

CHUNG, S. K.; OSAWA, T.; KAWAKISHI, S. Hydroxyl radical scavenging effect of spices and scavengers from Brown Mustard (*Brassica nigra*). **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 61, p. 118-124, 1997.

COLLINSON, E. J.; WHEELER, G. L.; GARRIDO, E. O.; AVERY, A. M.; AVERY, S. V.; GRANT, C. The Yeast Glutaredoxins are Active as Glutathione Peroxidases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 19, p. 16712- 16717, 2002.

COSTA, E. L. Efeito do processamento térmico e enzimático na obtenção de hidrolisados do isolado protéico do soro de leite com atividade anti-hipertensiva. **Tese de Doutorado**. Universidade Estadual de Campinas. FEA, 2004, 115p.

COSTA, E. L.; GONTIJO, J. A. R.; NETTO, F. M. Effect of heat and enzymatic treatment on the antihypertensive activity of whey protein hydrolysates. **International Dairy Journal**, v.17, n. 7, p. 632-640, 2007.

DAS NEVES, R. A. M.; CAMPOS, T.; MARQUEZ, U. M. L. Modulação da Pressão Arterial por Hidrolisados Protéicos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 1, p. 81-86, 2006.

DE FELICE, S. L. The nutraceutical revolution: its impact on food industry. **Trends in Food Science and Technology**, v. 6, n. 2, p. 59-61, 1995.

DELLA TORRE, J. C. M.; LICHTIG, J.; BERAQUET, N. J. Validação do método espectrofométrico para quantificação do aminoácido hidroxiprolina em conservas de carne. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 63, n.1, p. 35-42, 2004.

DIAZ, M. N.; FREI, B.; VITA, J. A.; KEANEY, J. F. Antioxidants andtherosclerotic heart disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 337, p. 408-416, 1997.

DINIZ, F. M.; MARTIN, A. M. Use of response surface methodology to describe the combined effects of pH, temperature and E/S ratio on the hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) muscle. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 31, p. 419-426, 1996.

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.

EKANAYAKE, P.; LEE, Y. D.; LEE, J. Antioxidant activity of flesh and skin of *Eptatretus burgeri* (hag fish) and *Enedrias nebulosus* (white spotted eel) **Food Science and Technology International**, v. 10, n. 3, p. 0171–0177, 2004.

ELIAS, R. J.; KELLERBY, S. S.; DECKER, E. A. Antioxidant Activity of Proteins and Peptides. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 48, p. 430-441, 2008.

ERICKSON, M. C.; HULTIN, H. O. Influence of histidine on lipid peroxidation in sarcoplasmic reticulum. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 292, p. 427-432, 1992.

FAITHONG, N.; BENJAKUL, S.; PHATCHARAT, S. BINSAN, W.; Chemical composition and antioxidative activity of Thai traditional fermented shrimp and krill products. **Food Chemistry**, v. 119, p. 133-140, 2010.

FAO - **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, Fishery Statistics 2005. Disponível em: <<http://www.fao.org/>>. Acesso em: 24 de outubro de 2006.

FARIA, M. G.; BATISTA, I. Actividade antioxidante de hidrolisados proteicos de bacalhau, salmão e solha. **Relatórios Científicos e Técnicos, IPIMAR**, Série digital (<http://ipimar-iniap.ipimar.pt>), n. 36, 2007, 31p.

FERREIRA, I. C. F. R.; BAPTISTA, P.; VILAS-BOAS, M.; BARROS, L. Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. **Food Chemistry**, v. 100, p. 1511-1516, 2007.

FOH, M. B. K.; QIXING, J.; AMADOU, I.; XIA, W.S. Influence of ultrafiltration on antioxidant activity of tilapia (*Oreochromis niloticus*) protein hydrolysate. **Advance Journal of Food Science and Technology**, v.2, n. 5, p. 227-235, 2010.

FONKWE, L. G.; SINGH, R. K.; Protein recovery from mechanically deboned turkey residue by enzymic hydrolysis. **Process Biochemistry**, v. 31, n. 6, p. 605-616, 1996.

FONTANA, A.; CENTENARO, G. S.; PALEZI, S. C.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Obtenção e avaliação de concentrados protéicos de corvina (*Micropogonias furnieri*) processados por extração química. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 61-66, 2009.

FRANKEL, E. N.; MEYER, A. S. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 1925-1941, 2000.

FUJII, Y.; WATANABE, K.; MARUYAMA, Y. Relation between the ATP-breakdown in ice-stored Alaska Pollack meat and the quality of frozen surimi. **Bulletin of Tokai Regional Fisheries Research Laboratory**, v. 75, p. 7-11, 1973.

GAUTHIER, S. F.; POULIOT, Y; SAINT-SAUVEUR, D. Immunomodulatory peptides obtained by the enzymatic hydrolysis of whey proteins. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 1315-1323, 2006.

GODOY FILHO, J. H. Aspectos tecnológicos de produtos empanados de frango. **Revista Nacional da Carne**, n. 246, p. 40-44, 1997.

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

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

GUÉRARD, F.; SELLOS, D.; LE GAL, Y. Fish and shellfish upgrading, traceability. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 96, p. 127-163, 2005.

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

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.

GULCIN, I.; BUYUKOKUROGLU, M. E.; OKTAY, M.; KUFREVIOGLU, O. I. Antioxidant and analgesic activities of turpentine of *Pinus nigra* Arn. subsp. *Pallsiana* (Lamb). Holmboe. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 86, p. 51-58, 2003.

GUTTERIDGE J M.; HALLIWELL B. The deoxyribose assay: an assay both for 'free' hydroxyl radical and for site-specific hydroxyl radical production. **Biochemical Journal**, v. 253, p. 932-940, 1988.

HAIMOVICI, M.; ABSALONSEN, L.; VELASCO, G.; MIRANDA, L. V. 2006. Diagnóstico do estoque e orientações para o ordenamento da pesca de *Umbrina canosai* (Berg, 1895). In: ROSSI-WONGTSCHOWSKI, C. L. D. B.; ÁVILA-DA-SILVA, A. O.; CERGOLE, M. C. (Ed.) **Análise das Principais Pescarias Comerciais da Região Sudeste-Sul do Brasil: Dinâmica Populacional das Espécies em Exploração – II**. São Paulo: USP, p. 77-85.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDAGE, J. M. C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. **Biochemistry Journal**, v. 219, p. 1-4, 1984.

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.

HINSBERGER, A.; SANDHU, B. K. Digestion and absorption. **Current Paediatric**, v. 14, p. 605-611, 2004.

HOU, H.; LI, B.; ZHAO, X.; ZHANG, Z. LI, P. Optimization of enzymatic hydrolysis of Alaska pollock frame for preparing protein hydrolysates with low-bitterness. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, p. 421-428, 2011.

HUANG, S. C.; KUO, J. C. Concentrations and antioxidative activity of anserine and

carosine in poultry meat extracts treated with demineralization and papain. **Proceedings of the National Science Council, Repub China B**, v. 24, n. 4, p.193-201, 2000.

IBAMA/CEPERG - **Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis**; Centro de Pesquisa e Gestão dos Recursos Pesqueiros Lagunares e Estuarinos; Projeto Estatística Pesqueira – Desembarque de pescado no Rio Grande do Sul 2008: Rio Grande, 2009. 41p.

ITO, N.; HIROSE, M.; FUKUSHIMA, S.; TSUDA, H.; SHIRAI, T.; TATEMATSU, M. Studies on antioxidants: their carcinogenic and modifying effects on chemical carcinogenesis. **Food Chemistry and Toxicology**, v. 24, p.1071-1082, 1986.

IUBMB - **International Union of Biochemistry and Molecular Biology** (NC-IUBMB). Disponível em: <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>>. Acesso em: 28 de março de 2011.

JAO, C.L.; KO, W. C. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging by protein hydrolysates from tuna cooking juice. **Fisheries Science**, v. 68, p. 430-435, 2002.

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

JE, J-Y.; KIM, S-Y.; KIM, S-K. Preparation and antioxidative activity of hoki frame protein hydrolysate using ultrafiltration membranes. **European Food Research Technology**, v. 221, p. 157-162, 2005a.

JE, J. Y.; PARK, P. J.; JUNG, W. K.; KIM, S. K. Isolation of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitor from fermented oyster sauce, *Crassostrea gigas*. **Food Chemistry**, v. 90, p. 809-814, 2005b.

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

JE, J-Y.; QIAN, Z-J.; BYUN, H-G, KIM S-K. Purification and characterization of an

antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 840-846, 2007.

JEON, Y. J.; BYUN, H. G. KIM, S. K. Improvement of functional properties of cod frame protein hydrolysates using ultrafiltration membranes. **Process Biochemistry**, v. 35 p. 471-478, 1999.

JIA, J.; MAA, H.; ZHAO, W.; WANG, Z.; TIAN, W.; LUO, L.; HE, R. The use of ultrasound for enzymatic preparation of ACE-inhibitory peptides from wheat germ protein. **Food Chemistry**, v. 119, p. 336-342, 2010.

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

KAHLON, T. S.; WOODRUFF, C. L. In vitro binding of bile acids by soy protein, pinto beans, black beans and wheat gluten. **Food Chemistry**, v. 79, n. 4, p. 425-429, 2002.

KELLY, P. M.; KELLY, J.; MEHRA, R.; OLDFIELD, D. J.; RAGGETT, E.; O'KENNEDY, B. T. Implementation of integrated membrane processes for pilot scale development of fractionated milk components. **Lait**, v. 80, p. 139-153, 2000

KHANTAPHANT, S.; BENJAKUL, S. Comparative study on the proteases from fish pyloric caeca and the use for production of gelatin hydrolysate with antioxidative activity. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, v. 151, p. 410-419, 2008.

KIM, G. H.; JEON, Y. J.; BYUN, H. G.; LEE, Y. S.; KIM, S. K. Effect of calcium compounds from oyster shell bound skin gelatin peptide in calcium deficient rats. **Journal of the Korean Fisheries Society**, v. 31, p. 149-159, 1998.

KIM, S-K.; KIM, Y-T.; BYUN, H-G.; PARK, P-J.; ITO, H. Purification and Characterization of Antioxidative Peptides from Bovine Skin. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 34, n. 3, p. 219-224, 2001a.

KIM, S. K.; KIM, Y. T.; BYUN, H. G.; NAM, K. S.; JOO, D. S.; SHAHIDI, F. Isolation and characterization of antioxidative peptides from gelatin hydrolysate of Alaska pollack skin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 1984-1989, 2001b.

KIM, S. K.; MENDIS, E. Bioactive compounds from marine processing byproducts - A Review. **Food Research International**, v. 39, p. 383-393, 2006.

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

KITTS, D. D. Antioxidant properties of casein phosphopeptides. **Trends in Food Science and Technology**, v. 16, p. 549-554, 2005.

KITTIPHATTANABAWON, P.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; NAGAI, T.; TANAKA, M. Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). **Food Chemistry**, v. 89, p. 363-372, 2005.

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

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

KRISTINSSON, H.G.; RASCO, B.A. Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical and Functional Properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 40, n.1, p. 43-81, 2000a.

KRISTINSSON, H. G.; RASCO, B. A. Biochemical and functional properties of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins hydrolyzed with various alkaline proteases. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 3, p. 657-66, 2000b.

KUROZAWA, L. E.; PARK, K. J.; HUBINGER, M. D. Influência das condições de processo

na cinética de hidrólise enzimática de carne de frango. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 3, p. 557-566, 2009.

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

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAHL, W. J.; BRAUN, S.D. Enzymatic Production of Protein Hydrolysates for Food Use. **Food Technology**, v. 48, n. 10, p. 68-71, 1994.

LEE, B. J.; HENDRICKS, D. G. Antioxidant effects of L-carnosine on liposomes and beef homogenates. **Journal Food Science**, v. 62, p. 931-934, 1997.

LEHNINGER, A. L. **Princípios de bioquímica**. 2ª edição, Ed. Sarvier, São Paulo, 1995, 975p.

LI, B.; CHEN, F.; WANG, X.; JI, B.; WU, Y. Isolation and identification of antioxidative peptides from porcine collagen hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization–mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 102, p. 1135-1143, 2007.

LI, F.; JIA, D.; YAO, K. Amino acid composition and functional properties of collagen polypeptide from Yak (*Bos grunniens*) bone. **LWT - Food Science and Technology**, v.42, p. 945-949, 2009.

LI, X. X.; HAN, L. J.; CHEN, L. J. In vitro antioxidant activity of protein hydrolysates prepared from corn gluten meal. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 88, n.9, p.1660-1666, 2008.

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.

LIU, J-H.; TIAN, Y-G.; WANG, Y.; NIE, S-P.; XIE, M-Y.; ZHU, S. WANG, C-Y.; ZHANG, P. Characterization and in vitro antioxidation of papain hydrolysate from black-bone silky fowl

(*Gallus gallus domesticus* Brisson) muscle and its fractions. **Food Research International**, v. 44, p. 133-138, 2011.

LIU, Q.; KONG, B.; XIONG, Y. L.; XIA, X. Antioxidant activity and functional properties of porcine plasma protein hydrolysate as influenced by the degree of hydrolysis. **Food Chemistry**, v. 118, p. 403-410, 2010.

MAILLARD, M. N.; SOUM, M. H.; MEYDANI, S. N.; BERSET, C. Antioxidant activity of barley and malt: Relationship with phenolic content. **Food Science and Technology**, v. 29, p. 238-244, 1996.

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

McCANN K. B.; SHIELL, B. J.; MICHALSKI, W. P.; LEE, A.; WAN, J.; ROGINSKI, H.; COVENTRY, M. J. Isolation and characterisation of a novel antibacterial peptide from bovine α_{S1} -casein. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 316-323, 2006.

MEISEL, H. Overview on milk protein-derived peptides. **International Dairy Journal**, v. 8, n.5/6, p. 363-373, 1998.

MEISEL, H.; FITZGERALD, R. J. Biofunctional peptides from milk proteins: mineral binding and cytomodulatory effects. **Current Pharmaceutical Design**, v. 9, p. 1289–1295, 2003.

MELO, E. A.; GUERRA, N. B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 36, n. 1, p. 1-11, 2002.

MENDIS, E., RAJAPAKSE, N., KIM, S. K. Antioxidant properties of radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 581-587, 2005a.

MENDIS, E.; RAJAPAKSE, N.; BYUNB, H.G.; KIM, S. K. Investigation of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin gelatin peptides for their in vitro antioxidant effects. **Life Sciences**, v. 77, p. 2166-2178, 2005b.

MILLER, N. J.; RICE-EVANS, C.; DAVIES, M. J.; GOPINATHAN, V.; MILNER, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. **Clinical Science**, v. 84, p. 407-412, 1993.

MILLER, A. T. Collagen sausage casing. **US Patent**, n° 4388331, 1983.

MILIAUSKAS, G.; VENSKUTONIS, P.; van BEEK, T. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. **Food Chemistry**, v. 85, p. 231-237, 2004.

MITSUTA, H.; YASUMOTO, K.; IWAMI, K. Antioxidative action of indole compounds during the autoxidation of linoleic acid. **Eiyo to Shokuryo**, v. 19, p. 210–214, 1966.

MONTAGNOLI, V. Filtração em linhas de pintura por eletrodeposição. **Revista Meio Filtrante**, ano 4, edição n° 17, novembro/dezembro de 2005.

MORAES, M. C. S. Estudo comparativo da gordura de capote, galinha caipira e frango-de-granja. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n.1, p. 15-24, 1987.

MOREIRA, R. S. R.; ZAPATA, J. F. F.; FUENTES, M. F. F.; SAMPAIO, E. M.; MAIA, G. A. Efeito da restrição de vitaminas e minerais na alimentação de frangos de corte sobre o rendimento e a composição da carne. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 1, 1998.

MORIMURA, S.; NAGATA, H.; UEMURA, Y.; FAHMI, A.; SHIGEMATSU, T.; KIDA, K. Development of an effective process for utilization of collagen from livestock and fish waste. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 1403-1412, 2002.

MOURA, C.; MUSZINSKI, P.; SCHMIDT, C.; ALMEIDA, J.; PINTO, L. Quitina e quitosana produzidas a partir de resíduos de camarão e siri: avaliação do processo em escala piloto. **Vetor**, Rio Grande, v. 16, n.1/2, p. 37-45, 2006.

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.

NAGAI, T.; SUZUKI, N. Isolation of collagen from fish waste material - skin, bone and fins. **Food Chemistry**, v. 68, p. 277-281, 2000.

NAGAI, T.; WORAWATTANAMATEEKUL, W.; SUZUKI, N.; NAKAMURA, T.; ITO, T.; FUJIKI, K. Isolation and characterization of collagen from rhizostomous jellyfish (*Rhopilema asamushi*). **Food Chemistry**, v. 70, p. 205-208, 2000.

NEIVA, G. S. Sumário sobre a pesca mundial, 2005. Disponível em: <<http://www.pescabrasil.com.br/comercial/artigo2.asp>>. Acesso em: 03 de novembro de 2010.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger principles of biochemistry. 4ª edição, W. H. Freeman, New York, 2004, 1119p.

NEVES, R. A. M.; MIRA, N. V. M. DE; MARQUEZ, U. M. L. Caracterização de hidrolisados enzimáticos de pescado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 1, p. 101-108, 2004.

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

ONODENALORE, A. C.; SHAHIDI, F. Protein dispersions and hydrolysates from shark (*Isurus oxyrinchus*). **Journal of Aquatic Food Production Technology**, v. 5, p. 43, 1996.

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

OGAWA, M.; PORTIER, R. J.; MOODY, M. W.; BELL, J.; SCHEXNAYDER, M. A.; LOSSO, J. N. Biochemical properties of bone and scale collagens isolated from the subtropical fish black drum (*Pogonia cromis*) and sheepshead seabream (*Archosargus probatocephalus*). **Food Chemistry**, v. 88, p. 495-501, 2004.

OLIVEIRA, M. S. Inibição de crescimento fúngico e sua produção de micotoxinas por compostos fenólicos presentes em vegetais e seus resíduos. **Dissertação de Mestrado**, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, 2005.

OLSEN, D.; YANG, C. L.; BODO, M.; CHANG, R.; LEIGH, S.; BAEZ, J.; D, PERALA, M.; HAMALAINEN, E. R.; JARVINEN, M.; POLAREK, J. Recombinant collagen and gelatin for drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, n. 12, p. 1547-1567, 2003.

ORDÓÑEZ, J. A. **Tecnologia de Alimentos – Alimentos de origem animal, vol. 2**, Editora Artmed, 2005.

OSAWA, T.; NAMIKI, M. Natural antioxidants isolated from eucalyptus leaf waxes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 33, p. 777-780, 1985.

OYAIZU, M. Antioxidative activities of browning products of glucosamine fractionated by organic solvent and thin-layer chromatography. **Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi**, v. 35, p. 771-775, 1988.

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 protéicos de soro de leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n.2, p. 333-338, 2005.

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

PARDI, M. C.; SANTOS, I. F.; SOUZA, E. R.; PARDI, H. S. **Ciência, Higiene e Tecnologia da Carne**, v.1, Editora UFG, Goiânia, 1993.

PARK, J. W. **Surimi and surimi seafood**. 1st ed. Marcel Dekker, NY, USA, 2000, 500 p.

PARK, P. J.; JUNG, W. K.; NAM, K. S.; SHAHIDI, F.; KIM, S. K. Purification and characterization of antioxidative peptides from protein hydrolysate of lecithin-free egg yolk. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 78, p. 651-656, 2001.

PARK, E. Y.; MURAKAMI, H.; MORI, T.; MATSUMURA, Y. Effects of protein and peptide addition on lipid oxidation in powder model system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p.137-144, 2005.

PATTERSON, C. E.; RHOADES, R. A. Protective role of sulfhydryl reagents in oxidant lung injury. **Experimental Lung Research**, v. 14, p. 1005-1019, 1988.

PENNA, E. W.; LILIENFELD, C.; VINAGRE, J.; FUENTES, A. Algunas propiedades funcionales de extensores carneos. **Fleischwirtschaft International**, v. 2, p. 14-16, 1991.

PHANTURAT, P.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; SITTIRUK ROYTRAKUL. Use of pyloric caeca extract from bigeye snapper (*Priacanthus macracanthus*) for the production of gelatin hydrolysate with antioxidative activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, p. 86-97, 2010.

PICOT, L.; RAVALLEC, R.; FOUCHEREAU-PÉRON, M.; VANDANJON, L.; JAOUEN, P.; CHAPLAIN-DEROUINIOT, M.; GUÉRARD, F.; CHABEAUD, A.; LEGAL, Y.; ALVAREZ, O. M.; BERGÉ, J-P.; PIOT, J-M.; BATISTA, I.; PIRES, C.; THORKELSSON, G.; DELANNOY, C.; JAKOBSEN, G.; JOHANSSONM, I.; BOURSEAUD, P. Impact of ultrafiltration and nanofiltration of an industrial fish protein hydrolysate on its bioactive properties. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, p. 1819-1826, 2010.

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

PIRES, C.; BATISTA, I.; GODINHO, V.; NUNES, M. L. Functional and biochemical characterization of proteins remaining in solution after isoelectric precipitation. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 17, n.1, p. 60-72, 2008.

POKORNY, J. Natural antioxidants for food use. **Trends in Food Science and Technology**, v. 2, p. 223-227, 1991.

PRICE, J. F.; SCHWEIGERT, B.S. **Ciencia de le carne y de los productos cárnicos**. Editorial Acribia, Zaragoza, 1994.

QIAN, Z-J.; JUNG, W-K.; KIM, S-K. Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, *Rana catesbeiana Shaw*. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 1690-1698, 2008.

QUAGLIA, G. B.; ORBAN, E. Enzymic solubilisation of proteins of Sardine (*Sardina pilchardus*) by commercial proteases. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, p. 263-239, 1987.

RAFECAS, M.; GUARDIOLA, F.; ILLERA, M.; CODONY, R.; BOATELLA, J. Liquid chromatographic determination of phenolic antioxidants in bakery products. **Journal of Chromatography A**, v. 822, p. 305-309, 1998.

RAGHAVAN, S.; KRISTINSSON, H. G.; LEEUWENBURGH, C. Radical scavenging and reducing ability of tilapia (*Oreochromis niloticus*) protein hydrolysates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 10359 -10367, 2008.

RAJAPAKSE, N.; MENDIS, E.; BYUN, H. G.; KIM, S. K. Purification and in vitro antioxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative systems. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 16, p. 562-569, 2005.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, 2006.

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 Biology and Medicine**, v. 26, p. 1231-1237, 1999.

REBECA, B. D.; PENA-VERA, M. T.; DIAZ-CASTANEDA, M. Production of fish protein hydrolysates with bacterial proteases, yield and nutritional value. **Journal of Food Science**, v. 56, p. 309-314, 1991.

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

RICHARDS, N. S. P. S. Soro lácteo: Perspectivas industriais e proteção ao meio ambiente. **Food Ingredients**, v. 3, n. 17, p. 20-27, 2002.

ROCHA, L. B.; GOISSIS, G.; ROSSI, M. A. Biocompatibility of anionic collagen matrix as scaffold for bone healing. **Biomaterials**, v. 23, n. 2, p. 449-456, 2002.

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 e Tecnologia de**

Alimentos, v. 27, n. 1, p. 53-60, 2007.

ROMAN, J. A.; SGARBIERI, V. C. Caracterização físico-química do isolado protéico de soro de leite e gelatina de origem bovina. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 10, n. 2, p. 137-143, 2007.

ROSA, C. S. Estudo das propriedades funcionais do colágeno obtido da pele de frango. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de Santa Maria, 2000.

ROSA, C. S.; HOELZEL, S. C.; VIERA, V. B.; BARRETO, P. M.; BEIRÃO, L. H. Atividade antioxidante do ácido hialurônico extraído da crista de frango. **Ciência Rural**, v. 38, n. 9, p. 2593-2598, 2008.

ROSENBERG, M. Current and future applications for membrane processes in the dairy industry. **Trends in Food Science and Technology**, v. 6, p. 12-19, 1995.

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

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, 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.

SADOWSKA, M.; KOLODZIEJSKA, I.; NIECIKOWSKA, C. Isolation of collagen from the skins of Baltic cod (*Gadus morhua*). **Food Chemistry**, v. 81, p. 257-262, 2003.

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

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

SALAS-MELLADO, M.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C.; MORAES, K. S.; ZAVAREZE, E. R. Produção de hidrolisado de cabrinha (*Prionotus punctatus*) e o efeito na composição química e características tecnológicas de pão. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 13, n. 3, p. 349-353, 2007.

SANCHEZ-MORENO, C. Compuestos polifenólicos: Efectos fisiológicos - Actividad antioxidante. **Alimentaria**, v. 239, p. 29-40, 2002.

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.

SELVAM, R.; DEVARAJ, S. Oxalate binding to rat kidney mitochondria: induction by oxidized glutathione. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, v. 33, p. 62-65, 1996.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos: Propriedades, Degradações e Modificações**. São Paulo: Livraria Varela, 1996.

SHAHIDI, F.; JANITHA, P. K.; WANASUNDARA, P. D. Phenolic antioxidants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 32, n. 1, p. 67-103, 1992.

SHAHIDI, F. Seafood Processing Byproducts. In: Shahidi, F. and J.R. Botta (Eds.), **Seafoods: Chemistry, Processing Technology and Quality**, 1st Edn., Blackie, London, U.K., p. 321-324. 1994.

SHAHIDI, F.; HAN, X-Q.; SYNOWIECKI, J. Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). **Food Chemistry**, v. 53, p. 285-293, 1995.

SHAHIDI, F.; KAMIL, Y. V. A. J. Enzymes from fish aquatic invertebrates and their application in the food industry. **Food Science and Technology**, v. 12, p. 435-464, 2001.

SHIH, F. F.; DAIGLE, K. W. Antioxidant properties of milled-rice co-products and their effects on lipid oxidation in ground beef. **Journal of Food Science**, v. 68, p. 2672-2675, 2003.

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.

SHIMADA, K., FUJIKAWA, K., YAHARA, K. AND NAKAMURA, T. Antioxidative properties of xanthan on the antioxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, v. 40, n. 6, p. 945-948, 1992.

SHIMIZU, M. Modulation of intestinal functions by food substances. **Nahrung**, v. 43, n.3, p. 154-158, 1999.

SHIMIZU, M.; SAWASHITA, N.; MORIMATSU, F.; ICHIKAWA, J.; TAGUCHI, Y.; IJIRI, Y.; YAMAMOTO, J. Antithrombotic papain-hydrolyzed peptides isolated from pork meat. **Thrombosis Research**, v. 123, n. 5, p. 753-757, 2008.

SINCOBESP. **Revista Graxaria Brasileira**. Indústria de Farinha e Gordura Animal. Edição n° 15, ano 3, 66p, 2010. Disponível em: <<http://editorastilo.com.br/portal/pdf/revistas>>. Acesso em: 02 de junho de 2010.

SKIERKA, E.; SADOWSKA, M.; MAJEWSKA, J. Optimization of protein recovery from cod backbone. **Veterinary Medicine**, v. 62, p. 579–582, 2006.

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

SOUISSI, N.; BOUGATEF, A.; TRIKI-ELLOUZ, Y.; NASRI, M. Biochemical and functional properties of sardinella (*Sardinella aurita*) by-product hydrolysates. **Food Technology and Biotechnology**, v. 45, n. 2, p. 187-194, 2007.

SPACKMAN, D. H.; STEIN, W. H.; MOORE, S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. **Analytical Chemistry**, v. 30, p. 1190-1206, 1958.

SUETSUNA, K. Antioxidant Peptides from the Protease Digest of Prawn (*Penaeus japonicus*) muscle. **Marine Biotechnology**, v. 2, p. 5-10, 2000.

SUN, J.; HE, H.; XIE, B. J. Novel antioxidant peptides from fermented mushroom *Ganoderma lucidum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 6646-6652, 2004.

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.

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.

TONHI, E.; PLEPIS, A. M. G. Obtenção e caracterização de blendas colágeno-quitosana. **Química Nova**, v. 25, n. 6, p. 943-948, 2002.

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

TULLIO, L. M. Isolamento e caracterização de glicomacropéptido do soro de leite. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2007, 81p.

UBABEF - **União Brasileira de Avicultura** - O frango pelo mundo. (Disponível em: <<http://www.brazilianchicken.com.br/industria-avicola/o-frango-pelo-mundo.php>> Acesso em: 10 de dezembro de 2011.

VELIOGLU, Y. S.; MAZZA, G.; GAO, L.; OOA, B. D. Antioxidant activity and total phenolic in selected fruits, vegetables, and grain products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 4113-4117, 1998.

VIOQUE, J.; CLEMENTE, A.; PEDROCHE, J.; YUST, M. M.; MILLÁN, F. Obtención y aplicaciones de hidrolizados protéicos. **Grasas y Aceites**, v. 52, n. 2, p. 132-136, 2001.

VIOQUE, J.; PEDROCHE, J.; YUST, M. M.; LQARI, H.; MEGÍAS, C.; GIRÓN-CALLE, J.; ALAIZ, M.; MILLÁN, F. Peptídeos Bioativos em Proteínas Vegetais de Reserva. **Brazilian Journal of Food Technology, III JIPCA**, n. 16, p. 99-102, 2006.

WALZEM R. L. Produtos e bebidas nutricionais. **Propriedades benéficas à saúde das proteínas de soro e frações de soro**. Monografia, A & M University, Texas, USA, 2007.

WANITA, A.; LORENZ, K. Antioxidant potential of 5-*N*-pentadecylresorcinol. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 20, p. 417-429, 1996.

WHITAKER, R. **Principles of Enzymology for Food Science**. Marcel Decker, N.Y., 1994.

WU, H. C.; CHEN, H. M.; SHIAU, C. Y. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). **Food Research International**, v. 36, p. 949-957, 2003.

WU, H. C.; SUN, P. B.; CHANG, C. L.; SHIAU; C. Y. Low-molecular-weight peptides as related to antioxidant properties of chicken essence. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 13, p. 176-183, 2005.

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

YEN, G-C.; CHEN, H-Y. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, n. 1, p. 27-32, 1995

YOU, L.; ZHAO, M.; CUI, C.; ZHAO, H.; YANG, B. Effect of degree of hydrolysis on the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 10, p. 235-240, 2009.

YU, L.; HALEY, S.; PERRET, J.; HARRIS, M.; WILSON, J.; QIAN, M. Free radical scavenging properties of wheat extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 1619-1624, 2002.

ZELECHOWSKA, E.; SADOWSKA, M.; TURK, M. Isolation and some properties of collagen from the backbone of Baltic cod (*Gadus morhua*). **Food Hydrocolloids**, v. 24, p. 325-329, 2010.

ZHONG, F.; LIU, J.; MA, J.; SHOEMAKER, C. F. Preparation of hypocholesterol peptides

from soy protein and their hypocholesterolemic effect in mice. **Food Research International**, v. 40, p. 661-667, 2007.

13 ANEXOS

SUMÁRIO

<i>LISTA DE ABREVIATURAS</i>	<i>i</i>
<i>LISTA DE FIGURAS</i>	<i>ii</i>
<i>LISTA DE TABELAS</i>	<i>vi</i>
<i>RESUMO GERAL</i>	<i>v</i>
<i>GENERAL ABSTRACT</i>	<i>vii</i>
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	4
2.1 OBJETIVO GERAL.....	4
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1 PESCADO.....	5
3.2 FRANGO.....	6
3.3 PROTEÍNAS DE ORIGEM ANIMAL.....	6
3.4 PROCESSOS ENZIMÁTICOS.....	9
3.4.1 Flavourzyme.....	13
3.4.2 α - Quimotripsina.....	13
3.4.3 Tripsina.....	14
3.5 ALIMENTOS DE NATUREZA PROTÉICA COM ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	14
3.6 HISTÓRICO SOBRE O USO DE ANTIOXIDANTES.....	16
3.7 ANTIOXIDANTES MAIS UTILIZADOS EM ALIMENTOS.....	17
3.7.1 Antioxidantes sintéticos.....	17
3.7.2 Antioxidantes naturais.....	18
3.8 CLASSIFICAÇÃO E MECANISMO DE AÇÃO DOS ANTIOXIDANTES.....	20
3.9 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS PEPTÍDEOS.....	20
3.10 MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	24
3.10.1 Método de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH).....	25
3.10.2 Método de sequestro do radical hidroxila ($\text{OH}\bullet$).....	25
3.10.3 Método Sequestro do radical 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS ⁺).....	26
3.10.4 Inibição da peroxidação lipídica.....	27
3.10.5 Poder Redutor.....	27
3.11 SEPARAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS USANDO ULTRAFILTRAÇÃO POR MEMBRANAS.....	27
3.12 DESMINERALIZAÇÃO.....	29
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
5 DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO	42
6 ESTUDO DA DESMINERALIZAÇÃO DE OSSOS DE PESCADO E DE FRANGO	43
6.1 INTRODUÇÃO.....	45
6.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	46
6.2.1 Matérias-primas.....	46
6.2.2 Remoção de proteínas não-colagenosas.....	46
6.2.3 Processo de desmineralização.....	46
6.2.4 Composição proximal das amostras.....	47
6.2.5 Determinação de Hidroxiprolina.....	47
6.2.6 Análise Estatística.....	47
6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
6.3.1 Composição proximal dos ossos de castanha e de frango.....	47
6.3.2 Desmineralização com solução de HCl.....	49
6.3.3 Desmineralização com solução de EDTA.....	51
6.4 CONCLUSÃO.....	52

6.5	AGRADECIMENTOS.....	52
6.6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
7	CARACTERÍSTICAS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE HIDROLISADOS PROTÉICOS DE OSSOS DE PESCADO E DE FRANGO	56
7.1	INTRODUÇÃO	58
7.2	MATERIAL E MÉTODOS	59
7.2.1	Matérias-primas.....	59
7.2.2	Remoção de proteínas não-colagenosas e desmineralização.....	59
7.2.3	Reagentes e Enzimas.....	59
7.2.4	Preparação dos hidrolisados protéicos.....	60
7.2.5	Determinação da distribuição do peso molecular.....	61
7.2.6	Determinação de cor.....	61
7.2.7	Determinação da atividade antioxidante	61
7.2.7.1	Inibição da peroxidação lipídica.....	61
7.2.7.2	Capacidade de sequestro do radical hidroxila	62
7.2.7.3	Capacidade de sequestro do radical livre DPPH.....	62
7.2.7.4	Captura do radical livre ABTS.....	63
7.2.7.5	Poder Redutor	63
7.2.8	Análise Estatística.....	63
7.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
7.3.1	Hidrólise enzimática dos ossos de pescado e de frango.....	64
7.3.2	Cor.....	65
7.3.3	Atividade Antioxidante dos hidrolisados protéicos de pescado e frango	65
7.3.3.1	Inibição da peroxidação lipídica.....	66
7.3.3.2	Capacidade de sequestro do radical hidroxila	67
7.3.3.3	Capacidade de sequestro do radical livre DPPH.....	68
7.3.3.4	Capacidade de sequestro do radical livre ABTS.....	70
7.3.3.5	Poder Redutor	71
7.3.4	Distribuição do peso molecular dos hidrolisados	72
7.4	CONCLUSÃO	72
7.5	AGRADECIMENTOS.....	73
7.6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
8	PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES E BIOQUÍMICAS DE HIDROLISADOS PROTÉICOS PREPARADOS A PARTIR DE MÚSCULO DE PESCADO E DE FRANGO	78
8.1	INTRODUÇÃO	80
8.2	MATERIAL E MÉTODOS	80
8.2.1	Matérias-primas.....	80
8.2.3	Reagentes e Enzimas.....	81
8.2.4	Preparação dos hidrolisados protéicos.....	81
8.2.5	Determinação da distribuição do peso molecular.....	82
8.2.6	Determinação de cor.....	82
8.2.7	Determinação da atividade antioxidante	82
8.2.7.1	Inibição da peroxidação lipídica.....	82
8.2.7.2	Capacidade de sequestro do radical hidroxila	83
8.2.7.3	Capacidade de sequestro do radical livre DPPH.....	83
8.2.7.4	Captura do radical livre ABTS.....	84
8.2.7.5	Poder Redutor	84
8.2.8	Determinação de grupos sulfidrila (-SH).....	84
8.2.9	Análise Estatística.....	85
8.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	85
8.3.1	Hidrólise enzimática do músculo de pescado e de frango.....	85
8.3.2	Cor.....	86
8.3.4	Atividade antioxidante dos hidrolisados	87
8.3.4.1	Inibição da peroxidação lipídica.....	87
8.3.4.2	Capacidade de sequestro do radical hidroxila	88
8.3.4.3	Capacidade de sequestro do radical livre DPPH.....	89

8.3.4.4	<i>Capacidade de sequestro do radical livre ABTS</i>	89
8.3.4.5	<i>Poder Redutor</i>	90
8.3.5	<i>Distribuição do peso molecular dos hidrolisados</i>	91
8.3.6	<i>Determinação de grupos sulfidril (-SH)</i>	91
8.4	CONCLUSÃO	92
8.5	AGRADECIMENTOS	93
8.6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
9	FRACIONAMENTO DE HIDROLISADOS PROTÉICOS DE PESCADO E FRANGO UTILIZANDO ULTRAFILTRAÇÃO POR MEMBRANAS: INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	99
9.1	INTRODUÇÃO	101
9.2	MATERIAL E MÉTODOS	102
9.2.1	<i>Matérias-primas</i>	102
9.2.2	<i>Reagentes e Enzimas</i>	103
9.2.3	<i>Preparação dos Hidrolisados Protéicos</i>	103
9.2.4	<i>Fracionamento por Ultrafiltração</i>	103
9.2.5	<i>Determinação da Distribuição do Peso Molecular</i>	104
9.2.6	<i>Eletroforese dos hidrolisados</i>	105
9.2.7	<i>Determinação da Atividade Antioxidante</i>	105
9.2.7.1	<i>Capacidade de sequestro do radical hidroxila</i>	105
9.2.7.2	<i>Capacidade de sequestro do radical livre DPPH</i>	106
9.2.7.3	<i>Capacidade de sequestro do radical livre ABTS</i>	106
9.2.7.4	<i>Poder Redutor</i>	106
9.2.8	<i>Atividade Antioxidante dos hidrolisados protéicos em Carne Moída</i>	107
9.2.9	<i>Composição de Aminoácidos dos hidrolisados</i>	107
9.2.10	<i>Análise Estatística</i>	107
9.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	108
9.3.1	<i>Hidrólise enzimática do músculo de pescado e frango</i>	108
9.3.2	<i>Fracionamento dos hidrolisados por Ultrafiltração (UF)</i>	108
9.3.3	<i>Distribuição do Peso Molecular</i>	109
9.3.4	<i>Eletroforese</i>	111
9.3.5	<i>Atividade Antioxidante das frações dos hidrolisados de músculo de pescado e frango</i>	113
9.3.5.1	<i>Capacidade de sequestro do radical hidroxila</i>	113
9.3.5.2	<i>Capacidade de sequestro do radical DPPH</i>	114
9.3.5.3	<i>Capacidade de sequestro do radical livre ABTS</i>	115
9.3.5.4	<i>Poder Redutor</i>	115
9.3.6	<i>Atividade Antioxidante em Carne Moída</i>	117
9.3.7	<i>Composição de Aminoácidos</i>	118
9.4	CONCLUSÃO	120
9.5	AGRADECIMENTOS	120
9.6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	120
10	CONCLUSÕES GERAIS	128
11	CONTRIBUIÇÕES E PERSPECTIVAS	130
12	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	131
13	ANEXOS	154