

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

Victor Jonas da Rocha Esperança

**OBTENÇÃO E APLICAÇÃO DE HIDROLISADOS PROTEICOS ANTIOXIDANTES  
PROVENIENTES DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE CLARA DE OVO EM PÓ**

Rio de Janeiro

Fevereiro, 2019

Victor Jonas da Rocha Esperança

OBTENÇÃO E APLICAÇÃO DE HIDROLISADOS PROTEICOS ANTIOXIDANTES  
PROVENIENTES DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE CLARA DE OVO EM PÓ

Dissertação de mestrado apresentado em  
cumprimento às exigências do Programa  
de Pós-Graduação em Alimentos e  
Nutrição, da Universidade Federal do  
Estado do Rio de Janeiro para a obtenção  
do grau de mestre em Alimentos e  
Nutrição

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Maria Gabriela  
Bello Koblitz - UNIRIO

Rio de Janeiro

Fevereiro, 2019

## FICHA CATALOGRÁFICA

77

Esperança, Victor Jonas da Rocha  
OBTENÇÃO E APLICAÇÃO DE HIDROLISADOS PROTEICOS  
ANTIOXIDANTES PROVENIENTES DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA  
DE CLARA DE OVO EM PÓ / Victor Jonas da Rocha  
Esperança. -- Rio de Janeiro, 2019.  
104 p

Orientadora: Maria Gabriela Bello Koblitz.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do  
Estado do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação  
em Alimentos e Nutrição, 2019.

1. ABTS. 2. ORAC. 3. TBARS. 4. homogenato de  
peixe . 5. homogenato de frango. I. Koblitz, Maria  
Gabriela Bello, orient. II. Título.

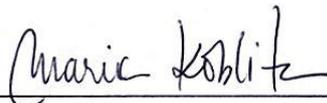
## FICHA EXAMINADORA

Victor Jonas da Rocha Esperança

OBTENÇÃO E APLICAÇÃO DE HIDROLISADOS PROTEICOS ANTIOXIDANTES  
PROVENIENTES DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE CLARA DE OVO EM PÓ

Dissertação de mestrado apresentado em cumprimento às exigências do Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro para a obtenção do grau de mestre em Alimentos e Nutrição

Aprovado em: 21/02/2019



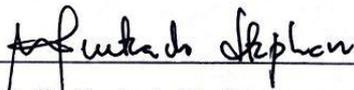
Dra Maria Gabriela Bello Koblitz (orientadora)

Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (PPGAN)



Dra Renata Valeriano Tonon

Embrapa Agroindústria de Alimentos



Dra Marília Penteado Stephan

Embrapa Agroindústria de Alimentos

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu Deus, que é do Deus do impossível e sem Ele eu não estaria vivo e nem muito menos teria chegado aqui;

À minha noiva e futura esposa Isabelle Paes Leme que sempre me incentivou e me acolheu nos momentos de desespero e tentativas de desistências;

Sou eternamente grato aos meus pais e a minha família por terem acreditado em mim e me dado todo o suporte sentimental, e a terem sempre priorizado a minha educação;

Aos meus amigos de formação escolar e acadêmica pela ajuda, conversas e apoio que sempre me deram ao longe desta jornada;

Aos meus amigos de laboratório (Joel, Matheus, Ticiane, Thaisa, Lana, Thuane, Larissa) pelas ajudas, parcerias e cumplicidade nas execuções dos trabalhos, nosso eterno NUGAM (Núcleo Gerenciador de Alternativas Metodológicas), o mais importante é saber que posso levar vocês comigo para toda a vida;

À minha amiga e “IC” Raiane Lira por ter dividido comigo essa missão e ter ficado horas noite à dentro nas hidrólises, muitas das vezes me deixando até doido quando trocava as enzimas;

À minha orientadora Maria Gabriela Bello Koblitiz por ter acreditado em mim e ter me dado essa grande oportunidade de conduzir essa pesquisa e me ensinar o amor pela ciência;

À Professora Mariana Simões Larraz Ferreira pela ajuda, apoio, suporte e as “co-orientações informais” e neste sentido, também estender meus agradecimentos a todas do Laboratório de Compostos Bioativos II e Cromatografia da UNIRIO;

Às Professoras Rosa Sá, Renata Borchetta, Fabrícia Junqueira e Lourdes Ferreirinha por terem acreditado muito em mim e me incentivado antes e após a minha graduação;

Agradecer à UNIRIO, minha segunda casa e lar acolhedor da qual já faço parte como aluno há sete anos e me encaminho para mais quatro anos agora no doutorado, se assim Deus permitir.

A todos que me ajudaram maneira direta ou indireta e que me arriscar em citar e acabar esquecendo alguém aqui seriam muita injustiça, o meu muito e sincero obrigado.

## RESUMO

O ovo é um alimento natural mundialmente consumido e uma fonte barata de proteína de excelente qualidade, além de conter gorduras, vitaminas, minerais e reduzida concentração calórica. É uma importante reserva de nutrientes favoráveis à saúde e capazes de prevenir doenças, agindo como antibacteriano, antiviral e na modulação do sistema imunológico. Devido a sua composição rica em proteínas, a clara de ovo vem sendo utilizada para obtenção de peptídeos com bioatividades, especialmente capacidade antioxidante. Uma das maiores limitações apontadas pelos autores na busca por esses hidrolisados é a dificuldade da reprodução dos resultados *in vitro* em análises *in vivo* e também carência de trabalhos consistentes na aplicação dos hidrolisados de ovo como conservantes em modelos de alimentos. Para uma maior eficiência na obtenção dos hidrolisados, tratamentos prévios podem ser utilizados de modo a deixar as proteínas mais biodisponíveis para digestão enzimática. Esse trabalho se propôs a obter hidrolisados protéicos de clara de ovo em pó com capacidade antioxidante por ação de três enzimas diferentes (papaína, pepsina e alcalase) com viabilidade para aplicação em modelo de alimento. Foram determinados os melhores tempos de hidrólise e métodos de secagem com base no rendimento e na capacidade antioxidante dos hidrolisados obtidos. Ferramentas *in vitro* e *in silico* foram comparadas para essas determinações. Os resultados *in vitro* apontaram a Alcalase como a melhor enzima para se obter hidrolisados com capacidade antioxidante e para a pepsina como a que obteve o melhor rendimento de hidrólise. As ferramentas *in silico* mostraram divergências quando comparadas aos resultados *in vitro*. Os métodos de secagem (*spray dryer* e liofilização) foram capazes de aumentar o poder antioxidante dos hidrolisados obtidos com papaína e Alcalase, e a secagem por *spray dryer* apresentou os melhores resultados, neste sentido. Os hidrolisados de clara de ovo em pó foram capazes de retardar a formação de substâncias reativas formadas pela degradação dos lipídeos de homogenatos de peixe (até 5 dias) e frango (até 14 dias) durante o armazenamento, demonstrando dessa forma sua capacidade em ser indicado para conservação desses alimentos em comparação com antioxidante sintético

Palavras-chave: ABTS, ORAC, TBARS, Bioinformática, homogenato de peixe ; homogenato de frango.

## ABSTRACT

### **OBTENTION AND APPLICATION OF ANTIOXIDANT PROTEIN HYDROLYSIS COMING FROM ENZYMATIC HYDROLYSIS OF WHITE EGG IN POWDER**

Eggs are a natural food consumed world-wide and a cheap source of protein of excellent quality, besides containing fats, vitamins, minerals and reduced caloric concentration. It is an important reservoir of nutrients that are health-friendly and capable of preventing diseases, acting as antibacterial, antiviral and modulating the immune system. Due to its rich protein composition, egg white has been used to obtain peptides with bioactivities, especially antioxidant capacity. One of the major limitations pointed out by the authors in the search for these hydrolysates is the difficulty of reproducing the *in vitro* results in *in vivo* analyzes and also the lack of consistent work in the application of the egg hydrolysates as preservatives in food models. For a greater efficiency in obtaining the hydrolysates, previous treatments can be used in order to leave the more bioavailable proteins for enzymatic digestion. The objective of this work was to obtain protein hydrolysates of powdered egg white powder with antioxidant capacity by the action of three different enzymes (papain, pepsin and Alcalase) with viability for application in food model. The best hydrolysis times and drying methods were determined based on the yield and antioxidant capacity of the hydrolysates obtained. *In vitro* and *in silico* tools were compared for these determinations. The *in vitro* results pointed to Alcalase as the best enzyme to obtain hydrolysates with antioxidant capacity and for pepsin as the one that obtained better hydrolysis yield. *In silico* tools showed differences when compared to *in vitro* results. The drying methods were able to increase the antioxidant power of the hydrolysates obtained from papain and Alcalase, and spray drying showed the best results in this sense. Powdered egg white hydrolysates were able to retard the formation of reactive substances formed by the lipid degradation of fish (up to 5 days) and chicken (up to 14 days) homogenates during storage. Demonstrating in this way its capacity to be indicated for conservation of these foods in comparison with synthetic antioxidant

Keywords: ABTS, ORAC, TBARS, Bioinformatics, fish homogenate; chicken homogenate.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Ovos de galinha (*Gallus gallus*)

Figura 2. Estruturas do ovo de galinha (*Gallus gallus*)

Figura 3. Exportação e produção de ovos nas regiões e estados do Brasil.

Figura 4. Etapas de processamento para obtenção da clara de ovo em pó.

Figura 5. Reações de formação de espécies reativas de oxigênio

Figura 6. Formação da ligação peptídica

Figura 7. Esquema da nomenclatura da especificidade do substrato de proteases

Figura 8: Fluxograma da metodologia do estudo dividida em etapas.

Figura 9. Hidrólise da clara de ovo em pó pela Alcalase

Figura 10. Hidrólise da clara de ovo em pó pela papaína

Figura 11. Hidrólise da clara de ovo em pó pela pepsina

Figura 12. Atividade antioxidante determinada pelo método de ABTS e ORAC nas amostras de hidrolisado de clara de ovo pelas enzimas Alcalase, papaína e pepsina ao longo do tempo.

Figura 13. Análise de capacidade antioxidante pelos métodos de ABTS e ORAC nos hidrolisados obtidos por Alcalase e papaína, secos por diferentes métodos

Figura 14. Determinação da peroxidação pela quantificação colorimétrica de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico expressas em equivalentes de malonaldeído (EqM) no homogenato de frango utilizando a amostra seca por *spray dryer* obtida da Alcalase

Figura 15. Determinação da peroxidação pela quantificação colorimétrica de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico expressas em equivalentes de malonaldeído (EqM) no homogenato de peixe utilizando a amostra seca por *spray dryer* obtida da Alcalase.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição em aminoácidos da clara de ovo desidratada.

Tabela 2. Proteínas da clara do ovo e algumas de suas características.

Tabela 3. Composição nutricional do ovo e suas estruturas.

Tabela 4. Peptídeos antioxidantes obtidos de hidrólise enzimática de ovos.

Tabela 5. Esquema de separação das amostras do homogenato de frango.

Tabela 6. Esquema de separação das amostras de homogenato de frango.

Tabela 7. Concentração de proteína durante a hidrólise nas amostras com e sem o tratamento térmico.

Tabela 8. Rendimento de hidrólise ao longo do tempo

Tabela 9. Rendimento da amostra pós-secagem

Tabela 10. Comparação dos rendimentos de hidrólise

Tabela 11. Análise de antioxidante *in silico*

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	7
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	9
2.1 OVOS.....	9
2.1.1 Composição estrutural e nutricional do ovo.....	10
2.1.1.1 <i>Proteínas da clara do ovo: bioatividade e funcionalidade</i> .....	14
2.1.2 Consumo, produção e industrialização de ovos .....	17
2.2 ALIMENTOS FUNCIONAIS E COMPOSTOS BIOATIVOS .....	20
2.2.1 Antioxidantes .....	21
2.3 PEPTÍDEOS BIOATIVOS .....	24
2.3.1 Peptídeos antioxidantes.....	26
2.4 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA .....	28
2.4 BIOINFORMÁTICA.....	31
<b>3 OBJETIVO</b> .....	33
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	34
4.1 MATERIAL.....	34
4.1.1 Material (Amostra).....	34
4.1.2 Reagentes e enzimas.....	34
4.1.3 Frango.....	34
4.1.4 Peixe .....	35
4.2 METODOLOGIA .....	35
4.2.1. Preparo da amostra .....	36
4.2.2. Tratamento térmico .....	37
4.2.3. Hidrólise <i>in vitro</i> .....	37
4.2.4. Determinação da concentração de proteínas .....	37
4.2.5. Determinação da concentração de peptídeos (Proteína solúvel em TCA 0,22M) ..	38
4.2.6. Rendimento da hidrólise.....	38
4.2.7. Eletroforese em gel desnaturante de poli(acrilamida) (SDS-PAGE).....	38
4.2.8 Avaliação da capacidade antioxidante <i>in vitro</i> .....	39
4.2.8.1 <i>ABTS</i> .....	39
4.2.8.2 <i>ORAC</i> .....	40
4.2.9 Secagem das amostras .....	41

4.2.10 Aplicação em modelo de alimento .....	41
4.2.11 Avaliação da estabilidade.....	43
4.2.12 Análise <i>in silico</i> .....	44
4.2.12.1 Hidólise <i>in silico</i> .....	44
4.2.12.2 Atividade antioxidante <i>in silico</i> .....	45
4.2.12. Avaliação estatística.....	45
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>46</b>
5.1 EFEITO DO TRATAMENTO TÉRMICO SOBRE A AÇÃO DAS PROTEASES.....	46
5.2 RENDIMENTO DE HIDRÓLISE.....	54
5.3 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE.....	55
5.4 SECAGEM DAS AMOSTRAS.....	59
5.5 APLICAÇÃO DO HIDROLISADO EM MODELO DE ALIMENTO .....	63
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>70</b>
<b>7 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>71</b>
APÊNDICE .....	96
ANEXO .....	99

## 1 INTRODUÇÃO

O ovo é um alimento natural mundialmente consumido e uma fonte barata de proteína de excelente qualidade, além de conter gorduras, vitaminas, minerais e reduzida concentração calórica. É uma importante reserva de nutrientes favoráveis à saúde e capazes de prevenir doenças, apresentando atividade antibacteriana, antiviral e na modulação do sistema imunológico. A qualidade deste alimento e a relação de preço comparativo com as outras proteínas de origem animal fazem dele uma opção de alimento nutritivo e um importante aliado no combate à fome (AMARAL et al, 2015). As principais estruturas do ovo são: a casca, chalazas, a clara (densa e fluída), a gema e a câmara de ar. Dentre elas destaca-se a clara que é responsável pelo maior conteúdo protéico do ovo. Nela estão contidas proteínas de alto valor biológico e de fácil digestibilidade, ricas em aminoácidos essenciais à saúde humana (NOVELLO et al., 2006; KOBLITZ, 2014). No Brasil o consumo de ovos é crescente, sendo o mais consumido o ovo de galinha, seguido pelo codorna e, em menor quantidade, pelos ovos de pata e de outras aves exóticas (ABPA, 2018; IBGE, 2018).

As proteínas dos alimentos têm ganhado cada vez mais destaque, especialmente devido à rápida expansão do conhecimento sobre peptídeos fisiologicamente ativos que estimulam e ampliam o interesse da academia e da indústria em estudar, identificar e caracterizar peptídeos bioativos a partir de fontes vegetais e animais (HARVEY e FERRIER, 2012; SARMADI et al., 2010). Neste sentido, diversas funções biológicas têm sido atribuídas aos peptídeos bioativos, entre elas: imunomoduladora, antimicrobiana, antitrombótica, hipocolesterolêmica, anti-hipertensiva e, em especial, a antioxidante (KORHONEN e PHILANTO, 2006; RIZZELLO et al., 2016). Frequentemente um mesmo peptídeo é capaz de apresentar mais de uma função biológica sendo determinado por muitos como peptídeo multifuncional (MOLLER et al., 2008; YOU et al., 2010).

No intuito de desenvolver antioxidantes naturais para aplicação em produtos alimentícios e, dessa forma, substituir antioxidantes sintéticos utilizados pela indústria como BHA (butilhidroxianisol), BHT (butilhidroxitolueno) e TBHQ (tercibutilhidroxiquinona), os peptídeos com potencial antioxidante vem ganhando a atenção de pesquisadores (SÁNCHEZ-RIVERA et al., 2014). Os hidrolisados protéicos de ovos demonstram ser excelentes fontes para obtenção de peptídeos bioativos, sendo também indicado o seu uso tanto na conservação de alimentos quanto como ingrediente funcional (DUAN et al. 2014; REN et al., 2014). Em razão

disto esse trabalho foi desenvolvido com o intuito de verificar o potencial antioxidante de hidrolisados obtidos com diferentes enzimas a partir de clara de ovo em pó e a viabilidade desses na aplicação para conservação de um modelo de alimento.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 OVOS

Os ovos, do ponto de vista biológico, são os óvulos, fecundados ou não, de algumas espécies animais. Trata-se de um corpo unicelular que concentra nutrientes essenciais para o desenvolvimento da espécie, sendo composto por protoplasmas, vesícula germinativa e envoltórios. Compreende-se por ovos, apenas os oriundos das espécies de galinhas (*Gallus gallus*), os originários de outras espécies devem ser denominados de acordo com a sua origem(ORNELLAS, 2001; PHILIPPI, 2006).



Figura 1. Ovos de galinha (*Gallus gallus*)

Fonte: TAEQ (2017)

As galinhas e o homem coexistiram por vários milênios, acredita-se que inicialmente as galinhas foram mantidas para atuar em disputas animais como “briga de galo” ou serem utilizadas em sacrifícios religiosos. Posteriormente, o desenvolvimento e uso de diferentes raças de galinha para alimentação, especialmente para produção de ovos, tornou-se evidente durante o Império Romano (ELSON, 2011). As raças de frango com características novas foram desenvolvidas durante a primeira metade do século XIX e distribuídas em toda a Europa (YAMADA, 1988). Algumas destas raças desenvolvidas contribuíram para as utilizadas na produção de frango atual (CHAMBERS et al, 2017).

Na produção de ovos mundial, atualmente, as raças de galinhas poedeiras mais utilizadas são as das linhagens ISA, Shaver, Hisex, Dekalb, Bovans e Babcock para produção de ovos com casca de cor branca e as raças Road Island e New Hampshire para produção de ovos com cascas marrons (AMARAL et al, 2015).

### 2.1.1 Composição estrutural e nutricional do ovo.

Estruturalmente o ovo divide-se em: membrana externa da casca; casca; membrana interna da casca (testácea); chalaza superior e inferior; clara fluída; clara densa; membrana vitelina superior e inferior (gema); vitelo branco (gema); vitelo amarelo (gema); blastócito (disco embrionário); câmara de ar e cutícula. Todavia as estruturas popularmente conhecidas são a casca, gema e clara (MINE e ZHANG, 2013; CHAMBERS et al, 2017).

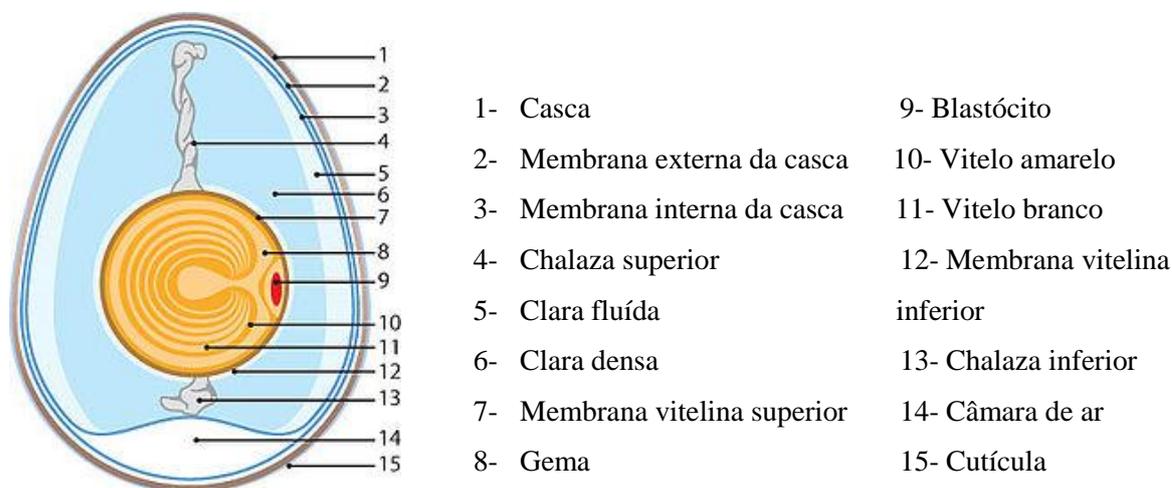


Figura 2. Estruturas do ovo de galinha (*Gallus gallus*)

Fonte: Adaptado de MAZZUCO (2008).

A casca do ovo é uma estrutura única na natureza, servindo como barreira primária às injúrias físicas e invasão de microrganismos. Esta estrutura é composta por uma matriz de

fibras protéicas e de polissacarídeos, que confere resistência e se divide em matriz esponjosa e protuberâncias mamilares, nesta matriz estão depositados carbonatos de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ). Trata-se de uma estrutura altamente porosa o que facilita a troca de gases entre os ambientes externo e interno. Sua coloração é determinada geneticamente variando de acordo com a linhagem, podendo variar do branco ao marrom escuro. A pigmentação é controlada por genes que regulam a deposição de porfirinas, a casca marrom apresenta uma resistência ligeiramente maior que a casca branca. Todavia é possível afirmar que a cor da casca não afeta a qualidade, características de cocção ou valor nutritivo (BERTECHINI, 2003; KOBLITZ, 2014).

A gema consiste em 28 % do peso líquido do ovo e concentra praticamente todo o conteúdo de gordura. Do extrato seco da gema, 66% são lipídeos e 33% proteínas, aproximadamente. A gema se caracteriza por ser uma emulsão que contém 50% de água, onde existem dois tipos de partículas dispersas: *gotículas de gema* (constituídas, sobretudo de lipoproteínas de baixa densidade, LDL) e *grânulos* (mais abundantes, muito menores e mais uniformes que as gotículas). Sua composição lipídica corresponde a aproximadamente 65% de triglicerídeos, 28-31% de fosfolipídeos e 5% de colesterol. Apresenta também todo o conteúdo de vitamina A, D e E encontrado no ovo, além de elementos minerais (incluindo ferro). A coloração amarelada característica da gema é devida à presença de pigmentos carotenóides lipossolúveis que pode variar bastante de acordo com o tipo de alimentação oferecida às aves (ANTON, 2007; MAZZUCO, 2008;).

A clara do ovo de galinha corresponde a 57 a 65% do peso total do ovo, é constituída por aproximadamente 88,5% de água, 10% de proteínas, lipídeos (0,03%) e carboidratos (0,8%), que podem estar associados a proteínas e minerais (0,5%). Em sua maioria as proteínas da clara são consideradas de alto valor biológico devido ao seu conteúdo de aminoácidos essenciais, disponíveis em quantidade adequada e necessários à nutrição humana (Tabela 1). Estruturalmente a clara pode ser dividida em: camada fluida externa e interna, camada densa (saco albuminoso) e chalazas (NYS e GUYOT, 2011; MINE e ZHANG, 2013).

Em relação ao perfil protéico, a clara do ovo é composta por mais de 40 tipos de proteínas. As principais proteínas presentes na clara do ovo em ordem de abundância são: *ovalbumina*; *ovotransferrina* ou *conalbumina*; *ovomucoide*; *ovoglobulina* dividida em G2 e G3; *ovomucina*; *lisozima*; *ovoinibidor*; *flavoproteína*; *ovomacroglobulina* e *avidina*, como pode ser observado na Tabela 2 (LI-CHAN e KIM, 2008).

Tabela 1. Composição em aminoácidos da clara de ovo desidratada.

<b>Aminoácidos</b>	<b>g/100 g de produto (81,1g de proteína)</b>
<b>Essenciais</b>	
Triptofano	0,999
Treonina	3,685
Isoleucina	4,581
Leucina	6,838
Lisina	5,515
Metionina	2,790
Cisteína	2,102
Fenilalanina	4,736
Tirosina	3,153
Valina	5,164
Histidina	1,830
Total	41,393
<b>Não essenciais</b>	
Alanina	4,684
Ácido Glutâmico	10,770
Glicina	2,842
Prolina	3,153
Serina	5,593
Ácido Aspartico	8,253
Arginina	4,412
Total	39,707

Fonte: USDA (2018)

Do ponto de vista nutricional o ovo é considerado um alimento de alta qualidade, pois apresenta grandes quantidades de proteínas de alto valor biológico, lipídeos, vitaminas (A, D, E e do complexo B), minerais (ferro, fósforo, selênio, zinco), carotenóides (luteína e zeaxantina), sendo também excelente fonte de colina (Tabela 3). A composição do ovo depende de vários fatores, tais como, alimentação, tipo de manejo, raça da ave e condições de armazenamento dos ovos (temperatura, umidade, local de estocagem). É importante ressaltar que a idade da ave influi no tamanho do ovo e na qualidade da casca e a dieta oferecida à ave influencia diretamente a composição nutricional da gema (protéica, de ácidos graxos e o conteúdo de colesterol) e sua coloração. As propriedades sensoriais dos ovos também podem variar tanto por razões genéticas da raça e idade da ave quanto diferenças no manejo (SOUZA-SOARES e SIEWERDT, 2005; ARAÚJO, 2013).

Tabela 2. Proteínas da clara do ovo e algumas de suas características.

Proteína	Abundância (%) <sup>a,b</sup>	Massa Molecular (kDa) <sup>a</sup>	Temperatura de desnaturação <sup>a,b</sup>
Ovalbumina	54	45	75-84
Ovotransferrina	12-13	77,7	61-65
Ovomucoide	11	28	77
Ovoglobulina G2	4	49	92.5
Ovoglobulina G3	4	49	ND <sup>c</sup>
Ovomucina	4	5,5-8,3x10 <sup>3</sup>	ND <sup>c</sup>
Lisozima	3,5	14.3	69-77
Ovoinibidor	1,5	ND <sup>c</sup>	ND <sup>c</sup>
Flavoproteína	0,8	32-35, 8	ND <sup>c</sup>
Ovomacroglobulina	0,5	760-900	ND <sup>c</sup>
Avidina	0,05	55-68,3	ND <sup>c</sup>

Fonte: Adaptado de <sup>a</sup> POWRIE, W.De NAKAI, S. (1985), <sup>b</sup> MINE e KOVACS-NOLAN(2004) e <sup>c</sup> Não Determinado.

Tabela 3. Composição nutricional do ovo e suas estruturas.

Nutrientes	Ovo inteiro (50g)	Clara (33g)	Gema (17g)
Calorias (Kcal)	74	17	55
Água (g)	38	28,9	8,89
Proteínas (g)	6,3	3,6	2,7
Carboidratos (g)	0,8	0,2	0,6
Gorduras totais (g)	5	0,06	4,51
Gorduras polinsaturadas(g)	0,7	0	0,7
Gorduras monoinsaturadas (g)	2,0	0	1,9
Gorduras saturadas (g)	1,5	0	1,5
Colesterol (mg)	212	0	212
Colina (mg)	125	0	125
Zeaxantina e Luteína (µg)	166	0	166
Vitamina A (UI)	244	0	244
Vitamina D (UI)	18	0	18
Vitamina E (µg)	0,5	0	0,44
Vitamina B12 (µg)	0,64	0,03	0,33
Ácido fólico (µg)	24	1	23
Riboflavina B2 (mg)	0,24	0,5	0,09
Cálcio (mg)	27	2	22
Sódio (mg)	70	55	8
Potássio (mg)	67	54	19
Fósforo (mg)	96	5	66
Magnésio (mg)	6	4	1
Ferro (mg)	0,9	0,03	0,4
Zinco (mg)	0,6	0,01	0,39

Fonte: Adaptado de USDA (2018).

### *2.1.1.1 Proteínas da clara do ovo: bioatividade e funcionalidade.*

Existem algumas proteínas presentes no ovo, mais precisamente na clara do ovo, que são capazes de apresentar diferentes formas de bioatividade. A seguir serão apontadas as principais estudadas.

#### Ovalbumina

A ovalbumina, a mais abundante proteína da clara de ovo, é classificada como fosfoglicoproteína composta por três subunidades com diferentes grupos fosfato e um único carboidrato ligado ao seu N-terminal (LI-CHAN et al., 1995). A ovalbumina é encontrada em três diferentes isoformas, especificamente A1, A2 e A3, nas seguintes proporções, respectivamente: 85: 12: 3. Esta proteína é caracterizada por uma estrutura globular fortemente compactada e contém mais de 50% de aminoácidos hidrofóbicos, que são protegidos principalmente dentro desta estrutura globular. Tem massa molecular de 45 kDa, 386 resíduos de aminoácidos, ponto isoelétrico de 4,5 e pertence à família das serpinas, apesar de não apresentar atividade inibitória de proteases característica dessas proteínas (YU et al., 2014). A ovalbumina é a única proteína de clara de ovo com grupos sulfidríla livres, e cada molécula contém quatro desses grupos. A bioatividade da ovoalbumina não foi bem elucidada e acredita-se que, no ovo, sua função seja de proteínas de reserva (MINE e ZHANG, 2013). No entanto, quando esta proteína é submetida a hidrólise enzimática, seu hidrolisado tem sido relatado como inibidor da ECA I (enzima conversora de angiotensina I), atividade anti-hipertensiva, antioxidante e antimicrobiana (LIU et al., 2017). Para a aplicação da ovalbumina na indústria de alimentos, a funcionalidade da ovalbumina é principalmente responsável pelas propriedades de espumação da clara de ovo (MINE e ZHANG, 2013).

#### Ovotransferrina

A ovotransferrina, também chamada de conalbumina, é uma glicoproteína monomérica que contém uma única cadeia de oligossacarídeos na parte C-terminal da proteína (LI-CHAN et al., 1995). Consiste em dois lóbulos globulares (lóbulos N e C) interligados por uma  $\alpha$ -hélice de 9 aminoácidos que pode ser liberada por digestão trípica (GIANSANTI et al., 2015). A ovotransferrina possui massa molecular de 78-80kDa, 686

resíduos de aminoácidos e, como é membro da família transferrina, tem atividade de ligação de ferro (STEVENS, 1991). Mason e colaboradores (1996) apontam que essa proteína tem a capacidade de ligar vários íons, especialmente íons férricos  $Fe^{3+}$ . Em comparação com a ovalbumina, a ovotransferrina é mais sensível ao calor, mas menos suscetível à desnaturação mecânica (YU et al., 2014). A ovotransferrina apresenta atividade antimicrobiana contra várias bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, fungos e vírus (GIANSANTI et al., 2015; KOVACS NOLAN et al., 2005). A hidrólise enzimática desta proteína é capaz de gerar hidrolisados com propriedades anti-hipertensiva (LIU et al., 2010), antidiabética (YU et al., 2011); antioxidante e anticoagulante (SHEN et al., 2010).

### Lisozima

A lisozima é uma proteína monomérica que possui massa molecular de 14,4 kDa e 129 resíduos de aminoácidos reticulados por quatro pontes dissulfeto e com ponto isoelétrico de 10,7 (LECHEVALIER et al., 2007; LI-CHAN e KIM, 2008). Trata-se de uma hidrolase N-acetilmurâmica capaz de hidrolisar ligações  $\beta$ -glicosídicas entre o ácido N-acetilneuramínico e N-acetil-glucosamina nos peptidoglicanos de parede das bactérias Gram-positivas, exibindo potencial antimicrobiano, mas com ação limitada contra bactérias Gram-negativas (BARON et al., 2016). Devido a esta capacidade, a lisozima é usada como conservante em uma variedade de alimentos como frutas frescas, vegetais, carnes e frutos do mar, bem como em cosméticos e em aplicações médicas (KERKAERT et al., 2010; GUARINO et al., 2011). Até certo ponto, a aplicação de lisozima ainda é limitada, porque bactérias Gram-negativas que estão frequentemente associadas à doenças alimentares não apresentam sensibilidade para esta proteína. Todavia, após hidrolisada, alguns peptídeos bioativos derivados da lisozima mostraram uma potente atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (*Escherichia. coli* K-12, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella enteritidis* e *Helicobacter. pylori*) (MINE et al., 2004; LIU, et al., 2017) e atividade antioxidante (YOU et al., 2010). A clara de ovo de galinha é uma das fontes mais abundantes de lisozima e é a principal fonte comercial de lisozima utilizada para manter a qualidade dos alimentos e produtos farmacêuticos (YOU et al., 2014).

### Ovomucina

A ovomucina é uma glicoproteína sulfatada encontrada na clara de ovo com subtipos insolúvel e solúvel (HIIDENHOVI, 2007). A ovomucina insolúvel desempenha um

papel fundamental na formação da clara densado ovo, enquanto a ovomucina solúvel é distribuída principalmente na clara fluida (BURLEY e VADEHRA, 1989; LI-CHAN e KIM, 2008). A ovomucina consiste em duas subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ -ovomucina que são encontradas tanto nos subtipos insolúveis quanto nos solúveis em diferentes proporções (LI-CHAN e KIM, 2008). A  $\alpha$ -ovomucina contém 91% de proteína e 9% de carboidrato com 2087 resíduos de aminoácidos e massa molecular de 230 e 250 kDa (WATANABE et al., 2004). A  $\beta$ -ovomucina consiste em 872 aminoácidos e tem massa molecular de cerca de 400 e 720 kDa (ITO et al., 1987; HIIDENHOVI, 2007; HAMMERSHØJ et al., 2008). Estudos relataram que a ovomucina tem potencial antiviral, atividade antitumoral e anti-colesterolêmica (TSUGE et al., 1996; 1997; YOKOTA et al., 1999; NAGAOKA et al., 2002). Além disso, os peptídeos derivados da hidrólise enzimática da ovomucina são capazes de exibir atividades antivirais e antitumorais (OMANA, et al 2009; 2010), ação hipocolesterolêmica (NAGAOKA et al., 2002) e também apresentam propriedades antioxidante e antibacteriana (LIU, et al., 2017).

#### Ovomucóide

A ovomucóide é uma glicoproteína termicamente estável que contém cerca de um quarto de ácido aspartico, 186 aminoácidos e massa molecular de 28 kDa (KATO et al., 1987; LI-CHAN e NAKAI, 1989). A ovomucóide é um inibidor de tripsina, catalase e quimotripsina, com três domínios distintos reticulados por pontes dissulfeto intradomínio (MINE e ZHANG, 2013; Yu et al., 2014). No total, nove pontes dissulfeto são identificadas na ovomucóide, enquanto nenhum grupo sulfidril livre é encontrado (MINE e ZHANG, 2013). A ovomucóide purificada de clara de ovo de galinha tem potencial alergênico para desencadear reações mediadas por IgE em humanos (MINE e ZHANG, 2001; MINE e RUPA, 2004). Hidrolisados obtidos de ovomucóide apresentam grande potencial para inibição da ECA I (enzima conversora de angiotensina I) (KOVACS-NOLAN et al., 2000; MARTOS et al., 2011). Além disso, a ovomucóide foi relatado como útil para a concepção de polímeros mucoadesivos para formulação de medicamentos (PLATE et al., 2002).

Ainda sobre as proteínas que apresentam funcionalidade no ovo, é possível destacar um grupo de proteínas relevantes, classificadas como inibidoras de proteases. Trata-se de proteínas presentes na clara de ovo que apresentam função de inibir, a atividade de enzimas proteolíticas. A clara de ovo é uma fonte rica de inibidores de proteases que demonstraram

inibir cisteína- e serina-proteases, proteases aspárticas e metaloproteases, as mais conhecidas são ovostatina, ovomucóide, ovoinibidor (SAXENA e TAYYAB, 1997; RÉHAULT, 2007). Dentre essas é possível destacar a ovostatina (ovomacroglobulina) e a ovoinidor.

Ovomacroglobulina é uma glicoproteína de elevada massa molecular (900 kDa) que apresenta ponto isoelétrico de 4,5. É fortemente antigênica e sofre desnaturação térmica em temperaturas entre 62 e 64°C em pH 7,0. Sua ação como inibidora da atividade proteolítica se assemelha à ação de  $\alpha$ -2-macroglobulinas do plasma sanguíneo, capazes de inibir a atividade das quatro principais classes de proteases (cisteína- e serina-proteases, proteases aspárticas e metaloproteases) (SGARBIERI, 1996; RÉHAULT, 2007).

Ovoinibidor é uma proteína capaz de inibir de tripsina e quimiotripsina. Além dessas enzimas, essa proteína também inibe proteases de fungos e bactérias. A ovoinibidor representa 1,5 % apenas da clara de ovo, possui peso de 49 kDa e ponto isoelétrico de 5,1 (SGARBIERI, 1996). Em menor quantidade na clara do ovo, estão presentes as proteínas avidina (0,05%) e a flavoproteína (0,8%) que são conhecidas por apresentarem como funcionalidade a capacidade de complexar vitaminas do complexo B (biotina e riboflavina, respectivamente). Presume-se que sua principal função é fixação de vitamina do soro do sangue da galinha para clara (MINE e ZHANG, 2013).

### 2.1.2 Consumo, produção e industrialização de ovos

Os ovos podem ser consumidos de diversas formas como: um alimento principal, onde eles podem ser mexidos, fritos, pochê, salgados, em conserva e cozidos; ou como ingrediente de preparações alimentícias, por exemplo, gemada, quindim, bolos e demais produtos de panificação (ORNELLAS, 2001). O consumo de ovos no Brasil é crescente, 192 unidades *per capita* foram consumidas no ano de 2017, uma unidade a mais que no ano anterior. Estima-se que no ano de 2018 este número tenha chegado a 212 unidades *per capita*, um recorde para o consumo nacional, contudo abaixo da média mundial de 230 unidades. O maior consumidor mundial é o México com 360 unidades *per capita* por ano, porém países como

Dinamarca estão na faixa de 300 unidades anuais *per capita* (ABPA, 2018; IBGE, 2018; UNA, 2018).

A produção de ovos no Brasil também é muito relevante, cerca de 99% da produção é destinada ao mercado interno e apenas 1% destinado à exportação, contudo o país está entre os 10 maiores produtores e exportadores de ovos do mundo, sendo a China o maior produtor mundial de ovos. No território brasileiro a produção de ovos vem crescendo em diversas regiões, a região com os maiores estados produtores é a Sudeste, tendo São Paulo como o maior produtor e Minas Gerais o maior exportador nacional de ovos (figura 3). Os maiores importadores de ovos brasileiros são os Emirados Árabes Unidos (3106 toneladas) e Japão (2162 toneladas) (ABPA, 2018; FAOSTAT, 2018; MAPA/AGROSTAT, 2013)

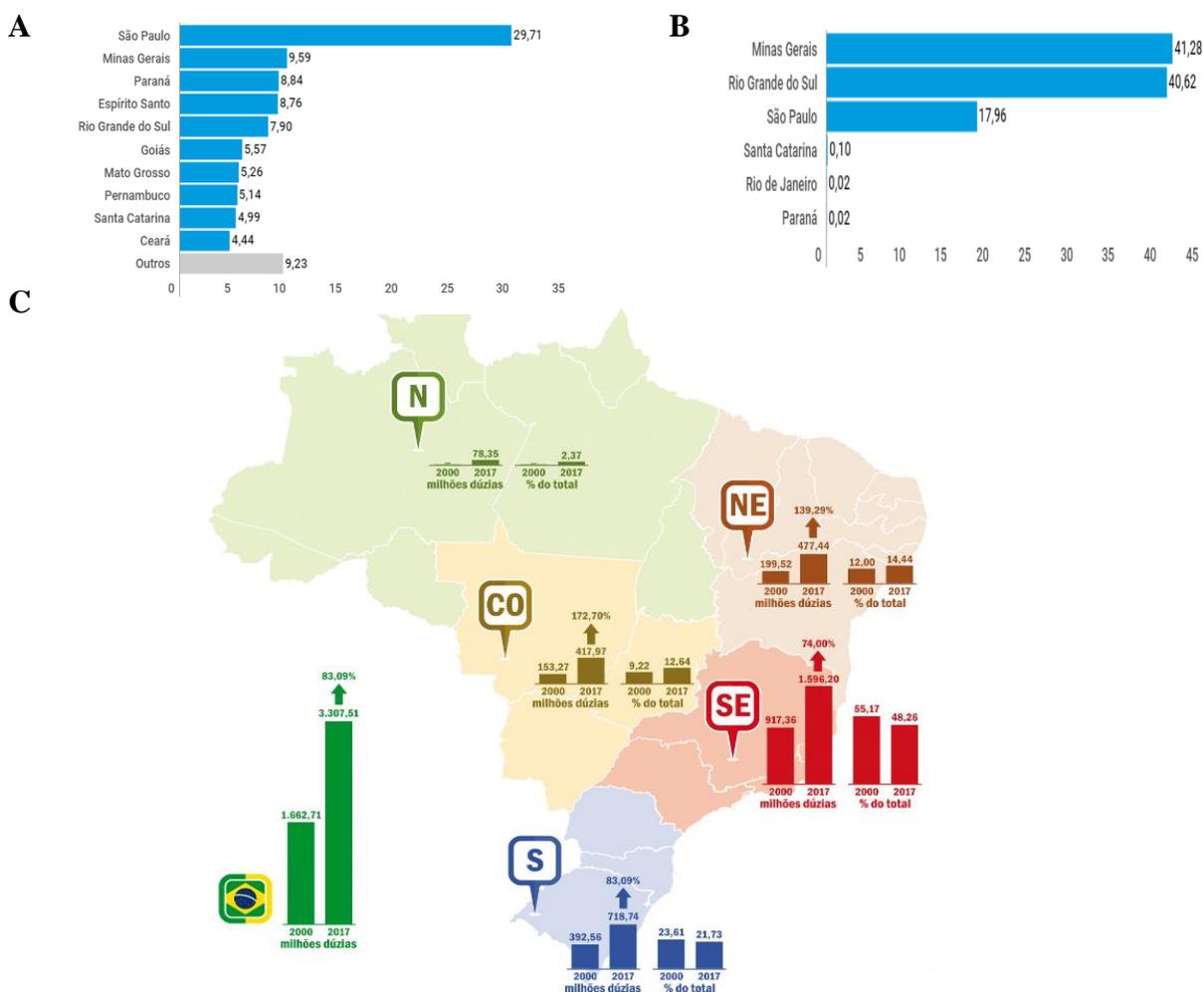


Figura 3. Exportação e produção de ovos nas regiões e estados do Brasil. **A:** Produção (%) de ovos nos estados do Brasil em 2017. **B:** Exportação (%) de ovos nos estados do Brasil em 2017. **C:** Produção de ovos nas regiões do Brasil dos anos 2000 e 2017. Fonte: EMBRAPA(2018).

Na indústria de alimentos os ovos são considerados excelentes ingredientes para agregar propriedades tecnológicas aos produtos, sendo utilizados como agentes emulsificantes, espumantes, geleificantes e até mesmo como corantes em produtos de panificação e confeitaria (ORDÓÑEZ, 2005). Dentre os componentes dos ovos com tais propriedades, a clara destaca-se como um bom espumante devido a sua funcionalidade tecnológica. Esta característica é muito importante e apreciada pela indústria, porque contribui para o volume e a textura de produtos alimentícios, uma vez que a incorporação de ar reduz a densidade do produto e aumenta seu volume. A clara pode ser usada fresca ou como “ovoproduto”, seja na forma desidratada (*spray-dryer*), líquida e refrigerada ou até mesmo congelada (STRIXNER e KULOZIK, 2011).

A clara desidratada apresenta diversas vantagens para sua escolha como “ovoproduto”, entre elas, a facilidade no transporte e no armazenamento, além da praticidade na aplicação como ingrediente. Entretanto, devido a sua composição de açúcares e à característica de termolabilidade de algumas de suas proteínas, o processo de secagem da clara (Figura 4) depende de alguns cuidados prévios. A retirada de açúcares (*desugarisation*), que pode ser feita através de fermentação microbiana ou hidrólise enzimática, tem por objetivo indisponibilizar os açúcares para utilização por microrganismos e, principalmente, evitar as reações de escurecimento não enzimático (*Maillard*) que provocam alteração sensorial do produto; a pasteurização (obrigatória por lei), que objetiva eliminar microrganismos patogênicos (especialmente *Salmonella* spp.), devendo ser realizada em temperaturas não muito elevadas (57°C por 3,5 min) para evitar dano às proteínas termolábeis presentes na clara (LECHEVALIER et al., 2010).

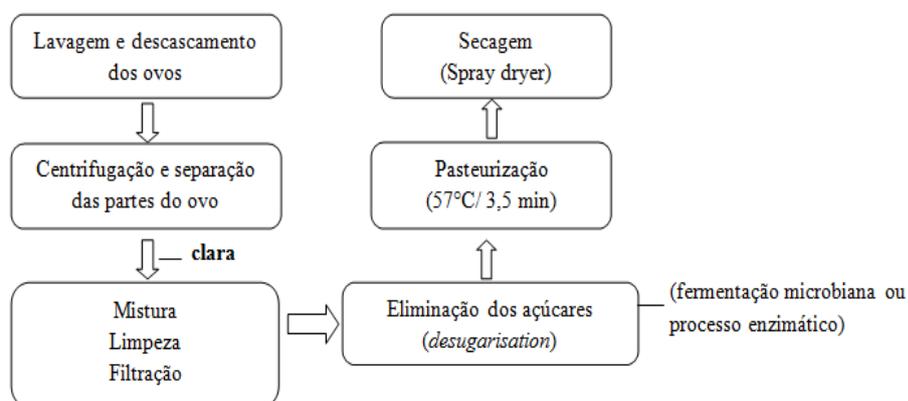


Figura 4. Etapas de processamento para obtenção da clara de ovo em pó.

Fonte: Adaptado de CUNHA et al. (2012)

Segundo o relatório anual da Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA, 2018), a produção de ovos industrializados (ovoprodutos) cresceu significativamente nos últimos anos e o número praticamente dobrou dos anos de 2016 para 2017, chegando a 39% das exportações de ovos do Brasil, tendo como maior comprador os Emirados Árabes Unidos (2796 toneladas de ovoprodutos), indicando um aumento importante da procura por esses produtos.

## 2.2 ALIMENTOS FUNCIONAIS E COMPOSTOS BIOATIVOS

A idealização de alimentos funcionais surgiu no Japão, na década de 1980, através de um programa de governo que tinha por objetivo produzir alimentos mais saudáveis para uma população que estava envelhecendo e possuía grande expectativa de vida (STRINGUETA et al., 2012). No Japão os alimentos funcionais são denominados como alimentos para uso específico na saúde (Foods for specified Health Use – FOSHU). Em 2002, a Associação Japonesa de Nutrição e Saúde Alimentar (Japan Health Food and Nutrition Association – JHFNA) definiu os “*FOSHU*” como alimentos compostos por ingredientes funcionais que afetam uma estrutura ou função no organismo (TEE, 2008).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), através da legislação vigente, aprovada em 1999, não define o termo “alimentos funcionais”, mas sim alegação de propriedade funcional que é “aquela relativa ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano”; e alegação de propriedade de saúde que “é aquela que afirma, sugere ou implica a existência da relação entre o alimento ou ingrediente com doença ou condição relacionada à saúde” (SILVA et al., 2016).

Alimentos funcionais não são considerados medicamentos, pois os princípios responsáveis pelos efeitos benéficos são extraídos do alimento (FALEIRO et al., 2008). Essas substâncias são conhecidas como compostos bioativos (HOLLMAN e KATAN, 1999; ZERAIK et al., 2010). Compostos bioativos são constituintes extranutricionais que

normalmente ocorrem em pequenas quantidades nos alimentos (KITTS, 1994) e vêm sendo intensivamente estudados para avaliar seus efeitos na saúde (Kris-Etherton et al., 2002)

Para a percepção dos efeitos funcionais dos compostos bioativos contidos nos alimentos, estes devem estar presentes em concentrações adequadas, de preferência incorporados no próprio alimento, inseridos dentro da alimentação. Diversos componentes dos alimentos podem atuar, em determinadas concentrações, como substâncias funcionais. Dentre estes componentes é possível ser mencionadas algumas vitaminas, minerais essenciais, proteínas e peptídeos, ácidos graxos poli-insaturados da família  $\omega$ -3 e componentes da fibra alimentar (SGARBIERI e PACHECO, 1999; VIDAL, et al., 2012).

Os alimentos funcionais são considerados uma grande tendência do mercado alimentício (RAUD-MATTEDI, 2008). Para que um alimento possa ser considerado funcional é necessária a demonstração da sua capacidade em afetar benéficamente funções alvo no corpo, além de possuir efeitos nutricionais adequados, de maneira que seja tanto relevante para o bem estar e a saúde quanto para a redução do risco de uma doença (ROBERFROID, 2002). No Brasil, para o registro de alimentos funcionais a empresa deve apresentar toda a documentação exigida nos regulamentos específicos, para os pedidos de registro de produtos nas categorias de alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde (Resolução n. 19, de 30 de abril de 1999) e de substâncias bioativas e probióticos isolados (Resolução RDC nº 2, de 07 de janeiro de 2002), assim como para as avaliações de propriedades funcionais (Assuntos de petição 4009, 406 e 403) (ANVISA, 2016).

### 2.2.1 Antioxidantes

Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias que, quando presentes em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável, são capazes de inibir ou retardar substancialmente a oxidação daquele substrato (HALLIWELL, 2012). São compostos químicos que podem prevenir ou diminuir os danos oxidativos de lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos causados por radicais livres (PIMENTEL et al., 2005). Os antioxidantes são importantes no combate aos processos oxidativos, pois minimizam os danos

cumulativos causados pelos radicais livres que podem ter como consequências doenças, por exemplo, câncer e cardiopatias (MITTLER, 2002).

O mecanismo de ação dos antioxidantes é bem variado, podendo se basear na remoção do oxigênio do meio, sequestro de espécies reativas de oxigênio, quelação de metais catalizadores da formação de radicais livres, regeneração de antioxidantes endógenos ou mesmo a interação de um ou mais mecanismos (MARRONI; MARRONI, 2002). Segundo NIKI(2009) os antioxidantes podem ser divididos quanto ao seu mecanismo de ação sobre os radicais livres em três grupos: os “*scavenger*”, que agem transformando o radical livre em outro menos reativo; os “*quencher*”, que são capazes de neutralizar completamente o radical livre através da absorção de toda a energia de excitação; e os que agem como sinalizadores celulares regulando os níveis de compostos antioxidantes e enzimas. RATNAM et al. (2006) dizem que os antioxidantes podem ser ainda classificados quanto a sua estrutura em enzimáticos e não enzimáticos.

Os radicais livres são definidos como qualquer espécie de existência independente, que contém um ou mais elétrons desemparelhados. Estes compostos são altamente reativos e instáveis e possuem vida curta (LIOCHEV, 2013). Os radicais livres ocorrem naturalmente no organismo de todos os seres vivos, devido à exposição ao oxigênio molecular, e são formados a partir de reações químicas de oxidorredução. Tanto o ganho como a perda de elétrons da oxidorredução podem gerar uma situação de desemparelhamento dos elétrons de uma molécula, tornando-a um radical livre (CHORILLI et al, 2007). As moléculas oxidadas tendem a atacar outras moléculas na tentativa de sequestrar elétrons e atingir a estabilidade. Esta ação pode gerar uma reação em cadeia, pois a molécula que foi “roubada” passa a ser um radical livre e tende a fazer o mesmo com outra molécula e assim por diante (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; BELADI-MOUSAVI et al., 2016).

O oxigênio ( $O_2$ ) está intimamente ligado a essas reações de oxidorredução. Devido a sua configuração eletrônica, o oxigênio tende a receber um elétron de cada vez, formando compostos intermediários altamente reativos, conhecidos como espécies reativas de oxigênio, que possuem a propriedade de se tornarem ou gerarem radicais livres (WINTERBOURN, 2008). Dentre as espécies reativas de oxigênio podemos destacar o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), a hidroxila ( $OH^-$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), todos componentes intermediários resultantes do ganho de elétrons do  $O_2$  (LOBO et al., 2010).

Os efeitos dos prejuízos causados pelas espécies reativas de oxigênio variam de acordo com o organismo estudado, idade, estado fisiológico e dieta (SANTOS, 2001). Estes radicais agem nas moléculas (proteínas, carboidratos, lipídeos e ácidos nucleicos) causando modificações químicas que podem levar à uma variedade de consequências biológicas, incluindo lesão tecidual, mutação, carcinogênese, comprometimento do sistema imunológico e morte celular (MENON, et al., 2016).

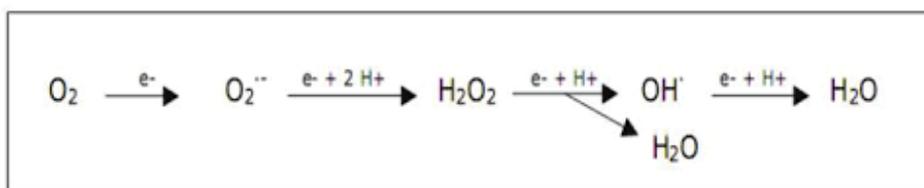


Figura 5. Reações de formação de espécies reativas de oxigênio.

Fonte: COTINGUIBA (2015)

Em alimentos ricos em lipídeos pode ocorrer a chamada oxidação lipídica, que reduz a qualidade dos alimentos afetando suas características sensoriais, além de formar radicais livres que são prejudiciais ao organismo humano (ORDÓÑEZ, 2005). Deste modo, com a finalidade de retardar esses processos oxidativos, antioxidantes vem sendo utilizados como aditivos alimentares para garantir a qualidade dos produtos e, principalmente, em alimentos com alto teor de lipídeos, para preservação do sabor, textura e a coloração do produto durante seu período de estocagem e armazenamento. Existem duas categorias básicas de antioxidantes em alimentos, denominados sintético e natural (VALENTIM et al, 2009; SCHULER, P. 2012; NIMSE e PAL, 2015)

Antioxidantes sintéticos são muito utilizados na preservação de alimentos e seus limites permitidos variam muito de país para país (YEHYE et al., 2015). Dentre os antioxidantes sintéticos utilizados pela indústria, destacam-se o BHA (butilhidroxianisol), BHT (butilhidroxitolueno) e TBHQ (tercibutilhidroquinona), que são aplicados em óleos e alimentos gordurosos para prevenir a deterioração oxidativa (SHAHIDI, 2000; BERMOND, 2012). Entretanto, propriedades carcinogênicas tem sido correlacionadas com o uso desses

antioxidantes em alimentos e, em consequência disto, pesquisas sobre o potencial de aplicação de antioxidantes naturais para conservação de alimentos, em detrimento dos sintéticos, tem recebido atenção da comunidade científica (BARLOW, 2012; SARDARODIYAN e MOHAMADI SANI, 2016).

### 2.3 PEPTÍDEOS BIOATIVOS

Peptídeos são compostos formados pela união de dois ou mais aminoácidos por intermédio de ligações peptídicas. Esta ligação ocorre entre o grupo carboxila de um aminoácido e o grupo amina de outro, tendo como consequência a liberação de água (LEHNINGER, 1993). Segundo o mesmo autor os peptídeos podem ser classificados em oligopeptídeos (2 a 10 resíduos de aminoácidos), polipeptídeos (11 a 100 resíduos de aminoácidos), já as proteínas são compostas de acima de 100 resíduos de aminoácido ou massa molecular maior que 10.000 Da. Os peptídeos nos alimentos podem ser resultados da digestão, hidrólise ou do processamento de proteínas presentes no alimento (HARTMAN e MEISEL, 2007).

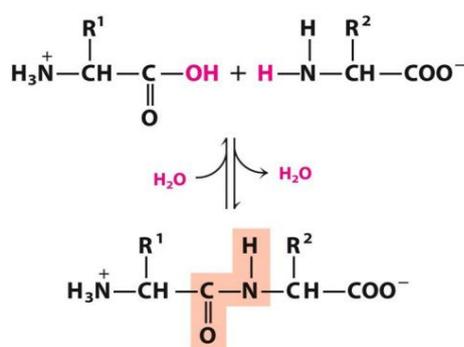


Figura 6. Formação da ligação peptídica

Fonte : Lehninger (1993)

Os peptídeos bioativos são aqueles que apresentam função regulatória dos sistemas do corpo humano, além da sua função nutritiva, sem apresentar risco à saúde de quem o ingere (MEISEL e FITZGERALD, 2003). Normalmente estes peptídeos possuem o tamanho de 2-20 aminoácidos e massa molecular de menos de 6000 Daltons(SUN et al., 2004). A atividade biológica é dada tanto pela sequência aminoacídica dos peptídeos, quanto pela composição de aminoácidos e por sua massa molecular (KORHONEN, 2006; MOLLER et al., 2008). Com base em suas propriedades estruturais, sua composição e sequências de aminoácidos, esses peptídeos podem desempenhar vários papéis, como opióides, ligantes de mineral, imunomoduladores, antimicrobianos, antioxidantes, antitrombóticos, hipocolesterolêmicos e anti-hipertensivos (SARMADI e ISMAIL, 2010). Além disso, vários peptídeos foram caracterizados por possuírem propriedades multifuncionais (MOURE, 2006).

O estudo dos peptídeos bioativos data de 1902, quando Starling e Bayliss descobriram uma substância secretada do revestimento intestinal com o potencial de estimular a secreção de enzimas digestivas pelo pâncreas (BAYLISS e STARLING, 1902). Em 1950, os peptídeos bioativos de fonte alimentar foram descobertos pela primeira vez por Mellander, que pesquisou os peptídeos fosforilados de caseína, que estimulavam a calcificação óssea de lactentes com deficiência de vitamina D (MELLANDER, 1950). Ao longo dos anos, uma quantidade considerável de trabalhos de pesquisa tem sido feita sobre o isolamento de peptídeos bioativos de várias fontes de alimentos e tem sido relatado que os peptídeos bioativos podem se originar de várias proteínas alimentares, como cereais, leguminosas, leite, carne, ovo, peixe e vários organismos marinhos (KEHINDE e SHARMA, 2018).

Peptídeos bioativos são considerados fragmentos específicos de proteínas que geralmente são inativos dentro da sequência da matriz proteica (ZENEZINI et al., 2016). As proteínas intactas, nativas dos alimentos, geralmente não apresentam ou apresentam pouca atividade biológica. Portanto, faz-se necessário a transformação dessas proteínas em peptídeos para que esses possam expressar sua funcionalidade. Essa transformação pode ser *in vivo* durante digestão, e *in vitro* por hidrólise enzimática ou fermentação microbiana (KORHONEN e PIHLANTO, 2006; ZOU et al., 2016). Uma das maneiras mais eficientes de se obter esses peptídeos é através da hidrólise enzimática (KORHONEN, 2009).

O ovo é uma excelente fonte para obtenção de peptídeos bioativos, principalmente a clara, devido ao seu alto conteúdo proteico (YU et al., 2011; REN et al 2014). Diversos

estudos têm mostrado que os peptídeos derivados de proteína de ovo podem exercer diversas atividades biológicas, incluindo atividade inibidora da enzima conversora de angiotensina I (ECAI) (DÁVALOS et al., 2004), anti-hipertensiva (JAHANDIDEH et al., 2016), antioxidante (CARRILLO et al. 2016), antimicrobiana (YAZDI, ASOODEH, e CHAMANI 2012), anti-inflamatória (PALIKA et al., 2015) e antidiabética(YU et al. 2011).

Muitos trabalhos também têm se dedicado ao estudo da obtenção de hidrolisados bioativos de ovo, principalmente com atividade antioxidante, seja para a aplicação na saúde, formulação de novos alimentos e suplementos ou para incorporação em alimentos (MINE et al 2013, REN et al 2014; NILARAMATNE et al., 2015). Contudo uma das maiores limitações apontadas pelos autores é a dificuldade da reprodução dos resultados *in vitro* em análises *in vivo* e também carência de trabalhos consistentes na aplicação dos hidrolisados de ovo como conservantes em modelos de alimentos (LIU et al., 2017). Geralmente os resultados desses hidrolisados apresentados nos ensaios *in vitro* quando aplicados em alimentos não apresentam boa atividade (CHEN et al., 2011;2012). Neste sentido há uma demanda para estudos na aplicação dos hidrolisados de ovo nos modelos de alimentos (CHANG et al , 2018)

### 2.3.1 Peptídeos antioxidantes

Peptídeos antioxidantes são inibidores potentes da oxidação de biomoléculas (por exemplo, proteínas, lipídios e DNA) devido à sua eficácia na eliminação de radicais livres e espécies reativas de oxigênio, inativando intermediários reativos e metais de transição pró-oxidativos (ELIAS et al., 2008). Além de poderem apresentar benefícios para a saúde, os peptídeos antioxidantes ajudam a combater o estresse oxidativo e, em alimentos, podem ser aplicados em produtos comerciais, evitando deterioração e oxidação durante o armazenamento e o processamento que produz mudanças indesejáveis na cor, sabor, textura e perfil nutricional, bem como produtos de reação potencialmente tóxicos (MINE et al, 2010). Em relação aos antioxidantes não proteicos, os peptídeos antioxidantes apresentam a vantagem de poderem apresentar, ao mesmo tempo, outras bioatividades (MINE et al, 2010; PIOVESANA et al., 2018), como por exemplo, no estudo de YAZDI et al (2012) onde

isolaram um peptídeo antioxidante com atividade antimicrobiana contra cepas de *Escherichia coli* e *Leuconostoc mesenteroides*.

As propriedades antioxidantes dos peptídeos estão diretamente relacionadas com a sua composição, estrutura e hidrofobicidade (CHEN et al., 1998). Normalmente, peptídeos antioxidantes contêm de 5 a 16 resíduos de aminoácidos, baixo peso molecular e devem ser considerados seguros do ponto de vista biológico, e apresentar alta atividade (CHEN, 1996; SARMADI e ISMAIL, 2010).

A hidrólise enzimática de proteínas alimentícias favorece a obtenção de peptídeos antioxidantes, pois promove a exposição de aminoácidos com características antioxidantes, como cisteína, metionina, triptofano, tirosina, fenilalanina e histidina, presentes na proteína matriz (SHEN et al., 2010). O potencial antioxidante desses aminoácidos se dá devido a sua capacidade de doar prótons para radicais deficientes em elétrons contribuindo desta forma para o sequestro de radicais livres (RAJAPAKSE et al., 2005).

Os bancos de dados sobre as sequências de peptídeos com capacidade antioxidante estão aumentando gradualmente, e ainda é difícil para os pesquisadores saber de antemão as atividades dos peptídeos resultantes de certas hidrólises enzimáticas (ZOU, et al 2016). Neste sentido alguns trabalhos vêm se dedicando à identificar, sequenciar e /ou purificar peptídeos antioxidantes obtidos de hidrólise enzimática de ovos (Tabela 4).

Tabela 4. Peptídeos antioxidantes obtidos de hidrólise enzimática de ovos.

<b>Estrutura / Proteína do ovo</b>	<b>Enzima</b>	<b>Peptídeo identificado</b>	<b>Autor</b>
<b>Lisozima (clara de ovo)</b>	Alcalase	KIVSDGNGM VSDGNGM RNTDGSTDYGIL KIVSDGNGMNAW	YOU et al. (2010)
<b>Ovalbumina (clara de ovo)</b>	Pepsina	YAEERYPIL SALAM YRGGLEPINF YQIGL	DAVÁLOS et al. (2004)
<b>Clara de ovo</b>	Papaína	YLGAK APIDFQ	CHEN et al. (2012)

A atividade antioxidante *in vitro* também sido examinada por muitas técnicas, devido aos diferentes mecanismos potencialmente envolvidos (RAO et al., 2012). Esses métodos incluem a capacidade de absorção de radical de oxigênio (ORAC), sequestro de radicais 1,1-difenil-2-picrilhidrazilil (DPPH), descoloração radicalar de 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfônico) (ABTS), poder redutor-antioxidante férrico (FRAP), peroxidação lipídica e ensaios quelantes de metais (ALAM et al., 2013). A realização destes testes *in vitro* com peptídeos obtidos de hidrolisados protéicos de ovos tem mostrado bons resultados demonstrando sua viabilidade na avaliação destas amostras (LIU et al., 2015; NIMALARATNE et al. 2015; JOAVANIC et al., 2016, LEE et al., 2017).

## 2.4 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

A denominação de hidrólise é dada para qualquer reação química que envolva a quebra de uma molécula por ação da molécula de água. A hidrólise pode ser realizada por processos químicos e físico-químicos, utilizando ácidos e bases, altas temperaturas e pressão; ou biológicos, por meio de enzimas (PERUZZO e CANTO, 1998).

A maneira mais utilizada para a produção de peptídeos bioativos *in vitro* é através da hidrólise enzimática que, não só mantém a composição de aminoácidos essenciais, como promove uma série de propriedades ao produto final (como digestibilidade, solubilidade, palatabilidade, sabor), tornando possível sua aplicação na indústria farmacêutica e de alimentos (SANMARTÍN et al., 2009). Geralmente, a hidrólise enzimática é amplamente aplicada para melhorar características funcionais (como propriedades emulsificantes de proteína hidrolisada) e propriedades nutricionais (biodisponibilidade de aminoácidos essenciais) de proteínas (YIM, et al 2000; CALDÉRON et al., 2000). Quando comparado com a hidrólise química, o uso da hidrólise enzimática é mais vantajoso por produzir hidrolisados mais homogêneos, tornar o hidrolisado mais palatável e manter o valor nutritivo do produto final (HE et al., 2013).

O processo enzimático é baseado no uso de uma única ou de diferentes combinações de proteinases. Os parâmetros críticos de hidrólise (temperatura, pH, solução aquosa ou

tamponada) devem ser otimizados de acordo com cada substrato de proteína e cada enzima ou combinação de enzimas selecionadas e devem ser mantidos durante a proteólise para assegurar a liberação eficiente de peptídeos (ALUKO, 2015).

As proteases, enzimas responsáveis pela hidrólise de proteínas, compreendem um grupo de enzimas muito importantes na indústria, que corresponde a cerca de 60% a 65% das enzimas comercializadas (SILVA et al., 2014). A especificidade das enzimas por sítios de clivagem do substrato (Figura 7) podem afetar a quantidade, sequência e composição de aminoácidos e o tamanho dos peptídeos formados, que, por sua vez, influencia a bioatividade, por exemplo, a capacidade antioxidante, dos hidrolisados (JEON et al., 1999; MOURE et al., 2006).

As enzimas mais aplicadas para hidrólise enzimática visando a obtenção de peptídeos bioativos com capacidade antioxidantes incluem Alcalase® (MOJICA, LUNA-VITAL E GONZALEZ DE MEJIA, 2018), a tripsina (DENG, GRUPPEN E WIERENGA, 2018), a pepsina (JIANG et al. 2017), a Flavourzyme® (WANG et al. 2015) e pancreatina (OSEGUERA-TOLEDO et al., 2016), sendo as mais utilizadas para hidrólise em clara de ovos a pepsina, a tripsina, a quimotripsina, a papaína, a Alcalase® e a Termolisina® (LIU et al., 2017). Estas proteases diferem não apenas em suas especificidades, mas também nas condições ótimas de atuação (pH e temperatura), o que irá contribuir para as características dos peptídeos resultantes e suas bioatividades (BANKUS e BOND, 2001)

A pepsina (EC 3.4.23.1) é uma protease aspártica de origem animal, produzida pela mucosa do estômago na forma inativa de pepsinogênio. Torna-se ativa por autólise em pH abaixo de 5,0 (RAJAGOPALAN et al., 1966). Apresenta maior atividade na faixa de pH de 1,0 a 4,0, sendo seu pH ótimo 2,0 e temperatura ótima 37°C. Inativa-se completamente em pH superior a 6,0 e temperaturas superiores a 60°C. Quanto a sua especificidade, a pepsina apresenta clivagem preferencial envolvendo resíduos hidrofóbicos, de preferência aromáticos, nas posições P1 e P2. Em geral, a pepsina cliva preferencialmente ligações envolvendo os aminoácidos fenilalanina e leucina e raramente cliva ligações envolvendo os aminoácidos histidina e lisina, a menos que sejam adjacentes aos aminoácidos anteriores (BRENDA, 2018).

A Alcalase® é uma enzima produzida por fermentação submersa pela bactéria *Bacillus licheniformis*, tendo sido desenvolvida pela empresa Novo Nordisk (Bagsvaerd, Dinamarca) para indústria de detergentes (KRISTINSSON et al., 2000). O principal componente enzimático é a subtilisina A ou subtilisina Carlsberg (EC 3.4.21.14), uma endopeptidase (HOYLE et al., 1994). As condições para desempenho toleráveis pela Alcalase® são temperaturas entre 45° e 65°C e pH entre 7,0 e 9,0, dependendo do tipo de substrato (ZAVAREZE et al., 2009). Apresenta baixa especificidade e tem preferência por clivar ligações envolvendo aminoácidos com grupamento R volumoso e não carregado (triptofano, tirosina, glutamina) em P1 (BRENDA, 2018).

A papaína é uma protease extraída do látex dos frutos do mamoeiro (*Carica papaya*) e pertence ao grupo das cisteína-proteases (TURK et al., 1997). Normalmente a papaína apresenta atividade proteolítica na faixa de pH 5 a 7, sendo seu pH ótimo 6,5, e é estável em altas temperaturas (SCHECHTER e BERGER, 1968). Apresenta alta especificidade, clivando preferencialmente ligações envolvendo aminoácidos com grande cadeia lateral hidrofóbica na posição P2, desde que não haja valina na posição P1 (BRENDA, 2018). O aparecimento de características sensoriais desagradáveis no hidrolisado, como o amargor, pode ocorrer e outras proteases podem ser necessárias para melhorar esta característica (FOX et al., 1968).

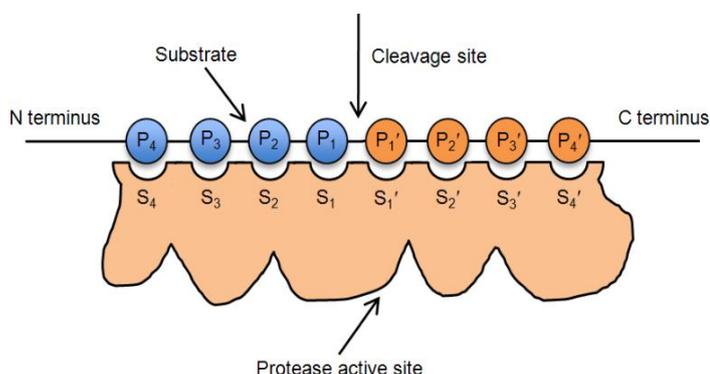


Figura 7. Esquema da nomenclatura da especificidade do substrato de proteases  
Fonte: PROSPER (2012)

A aplicação de diferentes tratamentos anteriores ao processo hidrolítico vem sendo considerado desejável para eliminação de inibidores de proteases, promoção da solubilização e desnaturação das proteínas a serem hidrolisadas e exposição de grupamentos protéicos mais susceptíveis à ação enzimática, como estratégia para aumentar o rendimento em peptídeos (LIU et al., 2017). Geralmente, os pré-tratamentos aumentam a taxa de hidrólise e o uso de tratamento térmico, micro-ondas, ultrassom, campos elétricos pulsantes e alterações do pH já

foram apontados como eficientes por diferentes autores (ULUKO et al., 2015; JOVANOVIĆ et al., 2016).

## 2.4 BIOINFORMÁTICA.

A bioinformática tem sido uma ferramenta muito útil para a simulação da digestão de proteínas *in silico* e a predição de diversas bioatividades. Programas como BIOPEP®, PEPTIDE RANKER®, PeptideMass®, Protein Data Bank® e outros têm surgido nesse sentido como ferramentas e bancos de dados para o desenvolvimento destas análises. A bioinformática, pela sua praticidade e tecnologia, vem ganhando a atenção significativa dos pesquisadores que procuram cada vez mais estudar a viabilidade e validação destes métodos (IWANIAK et al. 2015; MÄKINEN et al., 2016; NONGONIERMA et al., 2016)

A abordagem da bioinformática não consiste apenas na busca de um banco de dados de sequenciamento bioativo conhecido. Algoritmos capazes de prever a bioatividade com base no peptídeo, nas tendências recentes e desafios analíticos na separação, identificação e validação da sequência de peptídeos bioativos também estão disponíveis na bioinformática. Essa abordagem ajuda a contornar a necessidade de purificação, normalmente muito trabalhosa, do hidrolisado de partida, especialmente quando a especificidade de clivagem da protease utilizada não é muito conhecida. Diante disso, a classificação dos peptídeos de um grande número de possíveis candidatos pode ser realizado por tais algoritmos, que permitem a restrição do número de sequências bioativas mais prováveis (UDENIGWE, 2014; PIOVESANA et al., 2018)

O processo de identificação individual de peptídeos bioativos em uma mistura complexa do hidrolisado pode ser conceitualmente interessante. Isto porque frações que tenham seu potencial supostamente desconhecido, podem ser avaliadas individualmente ou em sinergia com a mistura dessas frações, com o objetivo de identificar se a bioatividade está presente no peptídeo ou no conjunto do hidrolisado, o que normalmente *in vitro* demandaria muitos processos para purificação, separação e identificação destes (SOARES et al., 2015; AGRAWAL et al., 2016; JAKUBCZYK et al., 2017). Neste nível, o uso da bioinformática

pode ser útil para selecionar individualmente peptídeos, pois permite a busca de sequências bioativas conhecidas ou a atribuição de uma probabilidade estatística a bioatividade, embora não seja aplicável para todas as bioatividades investigadas (LI-CHAN, 2015)

A pesquisa em bancos de dados de peptídeos bioativos, como o BIOPEP®, pode ajudar a identificar as sequências que já são conhecidas por sua bioatividade. O BIOPEP é constituído de bancos de dados de sequências de proteínas de alimentos, peptídeos bioativos, proteínas alergênicas com seus epítomos e sensores, resíduos únicos de aminoácidos e ferramentas para a avaliação de proteínas como precursores de peptídeos bioativos, incluindo o desenho do processo proteolítico. No entanto, independente das ferramentas utilizadas na detecção de possíveis peptídeos bioativos, a síntese/separação e avaliação de cada peptídeo individual é o único meio para a validação da bioatividade de cada sequência peptídica, o que é de extrema importância para obtenção de conclusões importantes acerca deste tema (MINKIEWICZ et al., 2008; WANG et al., 2017).

### 3 OBJETIVO

Objetivo geral.

Obter hidrolisados protéicos antioxidantes a partir da hidrólise enzimática de clara de ovo em pó, avaliar seu potencial *in vitro* e sua aplicação em modelo de alimento.

Objetivos específicos:

- 1- verificar o efeito do tratamento térmico prévio sobre eficiência da hidrólise e o rendimento;
- 2- selecionar o melhor hidrolisado a partir dos parâmetros de tempo de hidrólise, rendimento, potencial antioxidante e tipo de secagem;
- 3- verificar o potencial de aplicação dos hidrolisados protéicos como antioxidante natural em modelos de alimento;
- 4- comparar o potencial antioxidante da hidrólise *in vitro* com um modelo teórico *in silico*.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL

#### 4.1.1 Material (Amostra)

A clara de ovo pasteurizada e desidratada (Maxxi Ovos ®), denominada clara de ovo em pó (COP), foi obtida no comércio local da cidade do Rio de Janeiro. De acordo com as informações da rotulagem nutricional o material continha 0,86 g de proteína por 1 g de peso.

#### 4.1.2 Reagentes e enzimas

Os reagentes químicos utilizados - como alcoóis, sais, ácidos, bases – foram de grau analítico P.A ou superior. As enzimas proteolíticas purificadas utilizadas foram: papaína EC 3.4.22.2 (P3375 Sigma®), pepsina EC 3.4.23.1 (P6887 Sigma®) e Alcalase® EC 3.4.21.14 (P4860 Sigma®).

#### 4.1.3 Frango

As sobrecoxas de frango resfriadas foram adquiridas no comércio local da cidade do Rio de Janeiro, nos meses de junho e julho/2018. Foram transportadas em caixa térmica com gelo seco até o laboratório de análise, onde foram armazenados à temperatura de  $8 \pm 3$  °C até a sua utilização.

#### 4.1.4 Peixe

As sardinhas resfriadas foram adquiridas no comércio local da cidade do Rio de Janeiro, nos meses de agosto e setembro/2018. Foram transportadas em caixa térmica com gelo seco até o laboratório de análise, onde foram armazenadas a temperatura de  $8 \pm 3$  °C até a sua utilização.

#### 4.2 METODOLOGIA

O presente estudo foi dividido em três etapas: a primeira com a finalidade de averiguar a necessidade do tratamento térmico para aumentar a eficiência e rendimento da hidrólise, a segunda para a seleção do melhor hidrolisado obtido de acordo com o tempo, rendimento, potencial antioxidante e tipo de secagem; e a terceira para avaliar a aplicação dos hidrolisados em modelos de alimentos. O fluxograma na Figura 8 representa a metodologia que foi aplicada no presente estudo.

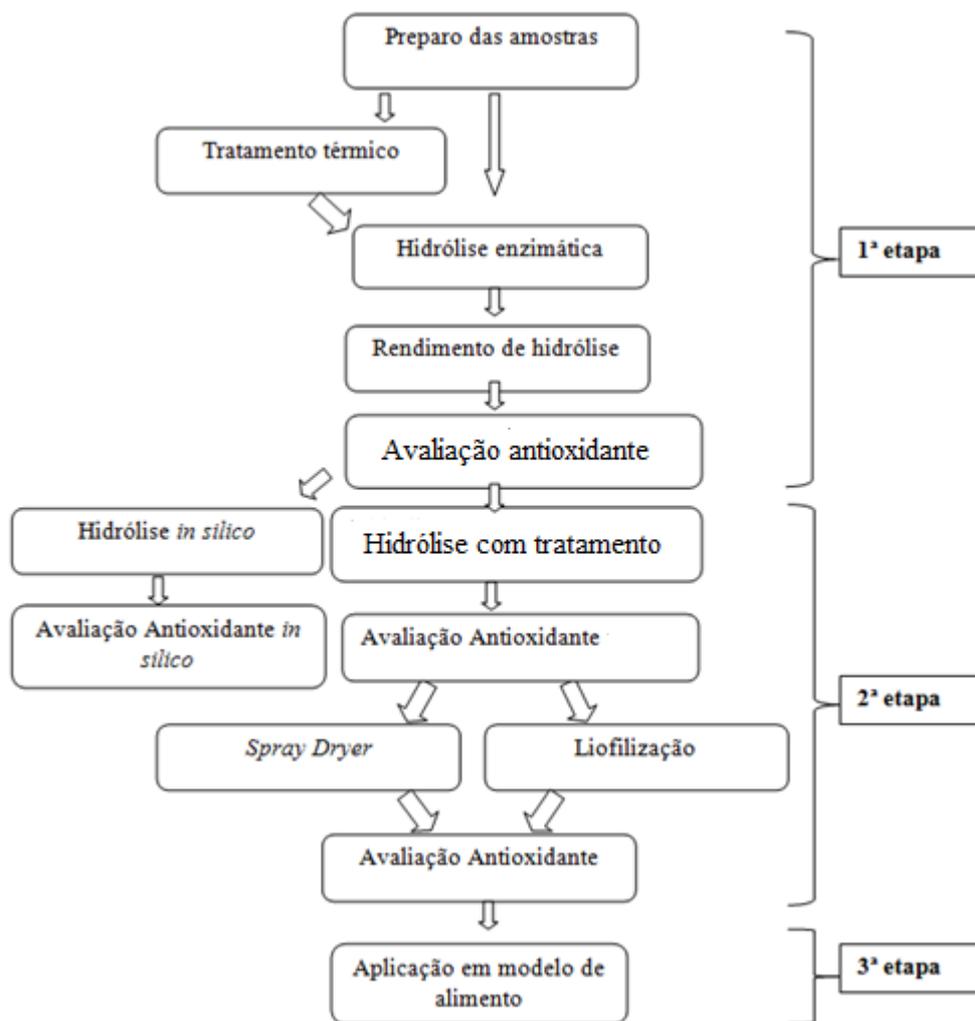


Figura 8: Fluxograma da metodologia do estudo dividida em etapas.

#### 4.2.1. Preparo da amostra

Para o preparo da amostra foram pesados 2,5 g de clara de ovo em pó, que foi dissolvida em 500 mL de água ultra-pura e homogeneizada por agitação magnética.

#### 4.2.2. Tratamento térmico

As amostras foram aquecidas em banho-maria, à temperatura de 90°C, por 10 minutos, sob agitação magnética, em chapa de aquecimento. Após o tempo de tratamento, as amostras foram resfriadas à temperatura de reação, em banho de gelo, e transferidas para reator encamisado acoplado a um banho termostático com bomba de circulação, para o controle da temperatura de hidrólise. Para cada amostra tratada foi preparada uma amostra sem tratamento térmico, utilizada como controle.

#### 4.2.3. Hidrólise *in vitro*

As reações de hidrólise foram realizadas sob agitação magnética. As enzimas utilizadas para hidrólise foram: papaína, pepsina e Alcalase®, na proporção de 1:80 (enzima:proteína). As condições de hidrólise foram - papaína: 60°C, pH=7,0; pepsina: 37°C, pH=2,0 e Alcalase®: 60°C, pH=8,0. O pH do meio reacional foi mantido constante pela adição de HCl (0,01 M) ou NaOH (0,01 M) ao longo do processo de hidrólise. As reações foram paralisadas pela adição de NaOH (papaína e pepsina) ou HCl (Alcalase®) até atingir pH de inativação das enzimas em uso, imediatamente resfriadas em banho de gelo e posteriormente congeladas em ultrafreezer à -80°C.

Durante o processo foram retiradas alíquotas de 5mL nos tempos de 0, 1, 30, 60, 120, 180 e 240 minutos para a determinação da concentração de proteínas da amostra na primeira etapa e nos tempos de 30, 60, 120, 180, 240, 300 e 360 minutos para determinação do rendimento, realizada na segunda etapa deste experimento.

#### 4.2.4. Determinação da concentração de proteínas

A dosagem colorimétrica de proteínas totais foi realizada através do método de Bradford (1976) usando uma curva-padrão de albumina de soro bovino (BSA), em

espectrofotômetro UV-Vis (Shimadzu UV-2700). Para as análises, as amostras aliqüotadas foram centrifugadas a 14.000 x g, por 10 minutos, a 5°C (Thermo Fischer Scientific, EUA) e o sobrenadante foi recolhido. As amostras foram avaliadas em triplicata.

#### 4.2.5. Determinação da concentração de peptídeos (Proteína solúvel em TCA 0,22M)

A determinação da concentração de peptídeos foi realizada baseada no modelo proposto por PERICIN et al. (2009) que avalia o teor de proteínas solúvel em ácido tricloroacético (TCA), com algumas modificações. Uma alíquota de 2,0 mL de hidrolisado foi adicionada a um volume igual de 0,44 mol.L<sup>-1</sup> de TCA. A mistura foi incubada *overnight* sob refrigeração e depois centrifugada a 14.000 x g, durante 10 min, a 5°C. O sobrenadante foi analisado utilizando o método de Lowry (1951), e o resultado foi quantificado com base em uma curva padrão de BSA. Todas as amostras foram avaliadas em triplicata.

#### 4.2.6. Rendimento da hidrólise

O rendimento da hidrólise enzimática foi calculado, com base nos teores de proteína total e proteína solúvel em TCA, de acordo com a Equação 1.

$$\text{Rendimento\%} = [\text{proteína solúvel em TCA}] / [\text{proteína total}] * 100 \quad (1)$$

#### 4.2.7. Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE).

A clara de ovo em pó e as amostras com e sem tratamento térmico prévidos hidrolisados tiveram seu perfil proteico analisado por gel de poliacrilamida de eletroforese sob condições desnaturantes de acordo com o método descrito por Laemmli (1970).

Para a análise, foi utilizado gel de resolução a 12 % e gel de empacotamento a 5 %. As amostras foram misturadas com tampão de amostra (8 % SDS, 40 % glicerol, 0,2 % azul de bromofenol e 20 %  $\beta$ -mercaptoetanol em 250 mM de tampão TRIS-HCl pH 6,8) em proporção de 1:4 (tampão de amostra:amostra) e então aquecidas a 100 °C por 5 min. para a aplicação no gel.

Três tempos diferentes da hidrólise foram analisados, sendo os tempos de 0 min, 60 min e o tempo de melhor rendimento para cada enzima (papaína 240 min; pepsina 180 min; Alcalase®120 min).

Para revelação do gel foi utilizado corante coomassie azul brilhante G-250. Para avaliação da qualidade da corrida e da massa molecular das proteínas foi utilizado marcador de massa molecular com capacidade de 6,1 kDa a 210 kDa (Bio Rad®).

#### 4.2.8 Avaliação da capacidade antioxidante *in vitro*

Para avaliação da capacidade antioxidante das amostras, foram utilizados os métodos ABTS, e ORAC, detalhados abaixo. Para esta avaliação foram coletados 15 mL de amostra dos hidrolisados nos tempos 0, 30, 60, 120, 180, 240, 300 e 360.

Para as análises de capacidade antioxidante da segunda etapa deste experimento foi utilizado um cálculo de ajuste, onde subtraiu-se de todos resultados de capacidade antioxidante o valor calculado para as amostras em branco (amostra não hidrolisada - tempo 0 de reação).

##### 4.2.8.1 ABTS

O teste de ABTS foi baseado segundo os autores Re et al. (1999) e Rufino et al. (2007), com algumas modificações. Preparou-se solução catiônica de ABTS (2,2-azinobis-3-

etilbenzotiazolina-6-sulfônico), a partir da mistura de 2,5 mL de solução ABTS 7,0mM e 44µL de solução de persulfato de potássio 140mM. A mistura reagiu por 16 horas em temperatura ambiente e na ausência de luz. Após a formação do radical ABTS•+, foi adicionado etanol à solução até obter um valor de absorvância de 0,700 ( $\pm 0,05$ ) a 734nm. Nos tubos de ensaio, colocou-se 2,5 mL da solução de ABTS, seguido da amostra nos seguintes volumes, 2,5 , 7,5 e 10 µL, e seu volume final foi completado com etanol até 3 mL. A determinação da absorvância das amostras foi realizada em temperatura de 23 °C ( $\pm 1$ ), após 6 minutos de reação, em espectrofotômetro (SHIMAZDU UV-200, Japão). O padrão como referência de antioxidante usado para esse teste foi o Trolox e os resultados foram expressos em TEAC (atividade antioxidante equivalente ao Trolox).

#### 4.2.8.2 ORAC

O método de ORAC foi realizado segundo Huang et al (2002), com algumas modificações. Foi alíquotado o referente a 0,01g das amostras e avolumado em um balão volumétrico de 20 mL com tampão fosfato. Para a análise, 20 µL das amostras em diferentes concentrações (0,01; 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6 e 0,7 g/L) foram adicionadas nos poços da microplaca, todos em triplicata. Em todos os poços, foi adicionado, em seguida, 120 µL da solução de fluoresceína e 60 µL de AAPH (2,2'-azinobis (2amidinopropano) dihidroclorato). A microplaca foi incubada por 3 horas a 37 °C. A leitura da fluoresceína foi realizada sob excitação a 485 nm e emissão a 535 nm (SPECTRAMAX i3x, DEVICES), com um espaço de 15 segundos entre uma leitura e outra. A partir dos dados de absorvância em relação aos tempos obtidos, foi calculada a área abaixo da curva (AUC). A atividade antioxidante do composto foi determinada através da diferença entre a área da amostra subtraída pela área do branco, medida pelo decaimento da fluorescência com a adição da substância antioxidante no decorrer do tempo. O padrão como referência de antioxidante usado para esse teste foi o Trolox e os resultados foram expressos em TEAC (atividade antioxidante equivalente ao Trolox).

#### 4.2.9 Secagem das amostras

Os hidrolisados com melhores tempos de rendimento e atividade antioxidante foram submetidos a dois diferentes métodos de secagem e posteriormente foram analisadas suas atividades antioxidantes para avaliar se a secagem afetava essa atividade. As amostras foram secas por liofilização (Liofilizador de bancada LD 1500B, TERRONI) durante 24 horas e por *spray dryer* (Mini Spray Dryer B-290, BUCHI). O rendimento de secagem foi dado pela Equação 5:

$$(\% \text{ Secagem}) = (\text{Peso de matéria seca após secagem} / \text{Peso de matéria seca antes da secagem}) \times 100 \text{ [5]}$$

#### 4.2.10 Aplicação em modelo de alimento

Para aplicação no modelo de alimento foi utilizado o hidrolisado que obteve o melhor resultado antioxidante e o melhor rendimento após a secagem. Como modelo de alimento foram preparados dois tipos de homegeinatos, um de frango e um de sardinha descritos a seguir.

##### -Homogenato de frango

O hidrolisado de clara de ovo em pó (HCOP) foi aplicado em um homogenato de frango e avaliado durante 14 dias de armazenamento. Os tempos das análises foram: 0; 1; 2; 7; 10 e 14 dias. A amostra correspondente ao tempo 0 foi analisada imediatamente após o preparo das amostras e o resultado da sua análise foi subtraído dos outros tempos. Para fins de comparação da análise foi utilizado o BHT como um antioxidante padrão. Como controle da análise uma amostra sem adição de nenhum antioxidante ou hidrolisado foi preparada, esta amostra foi denominada BRANCO. Uma outra amostra também sem adição de

antioxidante foi preparada e congelada. As quantidades e condições de armazenamento estão apresentadas na Tabela 5.

Para o preparo do homogenato foi utilizada a sobrecoxa de frango. Retirado o osso e o excesso de pele, o material foi lavado em água corrente. As amostras foram processadas em um multiprocessador por 1 minuto e 30 segundos, tendo como resultado uma massa homogênea, e em seguida, separada em porções de 40g. Ao homogenato de frango foram adicionadas quantidades de antioxidante sintético (BHT) ou do hidrolisado de ovo, posteriormente foram homogeneizados por 1 minuto também com o auxílio do multiprocessador e armazenados de acordo com a Tabela 5.

Tabela 5. Esquema de separação das amostras do homogenato de frango.

	<b>HCOP</b>	<b>Antioxidante BHT</b>	<b>Temperatura</b>
<b>BRANCO</b>	0	0	8°C ± 3°C
<b>CONGELADO</b>	0	0	-20°C ± 3°C
<b>HCOP 0,1%</b>	40mg	0	8°C ± 3°C
<b>HCOP 0,2%</b>	80mg	0	8°C ± 3°C
<b>BHT 0,1%</b>	0	40 mg	8°C ± 3°C

#### -Homogenato de sardinha

Outra análise também realizada foi a aplicação do HCOP em homogenato de sardinha e avaliação durante 5 dias de armazenamento. Os tempos das análises foram: 0; 1; 2; 3; 4 e 5 dias. A amostra correspondente ao tempo 0 foi analisada imediatamente após o preparo das amostras e o resultado da sua análise foi subtraído dos outros tempos. Para fins de comparação da análise além do BHT, foi utilizado o hidrolisado de isolado protéico de soja (HIPS) obtido conforme FARIAS (2017). Como controle da análise uma amostra sem adição de nenhum antioxidante ou hidrolisado foi preparada, esta amostra foi denominada BRANCO. Uma outra amostra também sem adição de antioxidantes ou hidrolisado foi preparada e congelada. As quantidades e condições de armazenamento são expressas na Tabela 6.

Para o preparo do homogenato de sardinha: inicialmente foram retiradas as escamas, cabeça, espinha dorsal, rabo, vísceras e barbatanas, em seguida o material foi lavado em água corrente. As vísceras foram retiradas cuidadosamente para que seu conteúdo não extravasasse na amostra. As amostras foram processadas em um multiprocessador por 1 minuto e 30 segundos, tendo como resultado uma massa homogênea, e em seguida, separada em porções de 40g.. Ao homogenato foram adicionadas quantidades de antioxidante sintético (BHT) ou HCOP ou HIPS, posteriormente homogeneizadas também com o auxílio do multiprocessador por 1 minuto e armazenadas de acordo com a tabela 6.

Tabela 6. Esquema de separação das amostras de homogenato de frango.

	<b>HIPS</b>	<b>HCOP</b>	<b>Antioxidante BHT</b>	<b>Temperatura</b>
<b>BRANCO</b>	0	0	0	8°C ± 3°C
<b>CONGELADO</b>	0	0	0	-20°C ± 3°C
<b>HCOP 0,1%</b>	0	40mg	0	8°C ± 3°C
<b>HIPS 0,1%</b>	40 mg	0	0	8°C ± 3°C
<b>BHT 0,1%</b>	0	0	40 mg	8°C ± 3°C

#### 4.2.11 Avaliação da estabilidade

O teste de TBARs (do inglês *thiobarbituric acid reactive substances* – substâncias reativas a ácido tiobarbitúrico) foi realizado segundo a metodologia proposta por de Vyncke (1970) com modificações, para avaliar a estabilidade oxidativa durante o período de armazenamento nas amostras de homogenatos de frango e sardinha. Para a extração das substâncias reativas foi pesado 1g de amostra de amostra e adicionado 25mL de solução a 7,5% de TCA, em seguida homogeneizadas com o auxílio do ULTRA-TURRAX® por 1 minuto. O extrato foi filtrado e 2 mL foram retirados e adicionados a 2mL de solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) (0,02M). Após incubação em banho-maria a 100°C durante 40 minutos, seguida de resfriamento até a temperatura ambiente em banho de gelo, as amostras foram avaliadas em espectrofotômetro (SHIMAZDU UV-200, Japão), a 532 nm.

Como solução padrão, a solução de TEP (1,1,3,3 – tetraetoxipropano) foi utilizada nas concentrações de 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 e 0,5 µmol/mL. Os resultados foram expressos como mg malonaldeído / Kg de produto.

#### 4.2.12 Análise *in silico*

A análise *in silico* foi realizada baseada no estudo de WANG et al.(2017), com algumas modificações.

##### 4.2.12.1 Hidólise *in silico*

Para a simulação da hidrólise foram selecionadas as principais proteínas (prevalência superior a 3%) da clara ovo. A sequência aminoacídica destas proteínas foi obtida na base de dados UniProt© (disponível em <https://www.uniprot.org/>). Posteriormente as proteínas tiveram sua digestão simulada no programa mMass - Open Source Mass Spectrometry Tool© (disponível em <http://www.mmass.org/>), os parâmetros (pH e temperatura) para a hidrólise *in silico* foram selecionados as mesmas condições da hidrólise *in vitro*. O rendimento teórico das hidrólises foi calculado de acordo com a Equação 3.

$$DH\% = (d / D) \times 100 \quad [3]$$

Onde: d é o número de ligações peptídicas hidrolisadas e D é o total numérico de ligações peptídicas na cadeia da proteína.

#### 4.2.12.2 Atividade antioxidante *in silico*

Após a digestão *in silico* os peptídeos gerados foram tabulados e ranqueados pelo programa Peptide Ranker© e foram selecionados os peptídeos que apresentavam percentuais acima de 50% de probabilidade de apresentarem alguma atividade biológica. Esses peptídeos foram tabulados e utilizados para busca usando o banco de peptídeos bioativos BIOPEP© para identificação da suas bioatividades. O valor de A%, que indica potencial de atividade biológica do peptídeo, segundo WANG et al.(2017), foi calculado pela Equação 4:

$$A(\%) = (\text{n}^\circ \text{Peptídeos antioxidantes} / \text{n}^\circ \text{Peptídeos total}) \times 100 \quad [4]$$

#### 4.2.12. Avaliação estatística

Os resultados obtidos foram expressos como média e desvio-padrão de, pelo menos, triplicatas. O programa utilizado foi *software* Graphpad Prism (Versão 5.0 - San Diego, CA, USA) usando a análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey ou Bonferroni ou o teste t de Student, quando apropriado. O valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 EFEITO DO TRATAMENTO TÉRMICO SOBRE A AÇÃO DAS PROTEASES.

A Tabela 7 apresenta o decréscimo da concentração de proteínas no meio reacional durante o processo de hidrólise, comparando amostras com (HT) e sem (NH) tratamento térmicoprévio.

Tabela 7. Concentração de proteína durante a hidrólise nas amostras com e sem o tratamento térmico.

Tempo (min)	Proteínas (mg/mL de amostra)					
	Papaína NH	Papaína HT	Alcalase NH	Alcalase HT	Pepsina NH	Pepsina HT
0	3,81 ± 0,05 <sup>Aab</sup>	3,91 ± 0,11 <sup>Aab</sup>	4,23 ± 0,35 <sup>Aa</sup>	2,01 ± 0,07 <sup>Ad</sup>	3,37 ± 0,06 <sup>Abc</sup>	3,33 ± 0,02 <sup>Ac</sup>
1	3,31 ± 0,05 <sup>Ba</sup>	3,20 ± 0,09 <sup>Ba</sup>	3,47 ± 0,42 <sup>ABa</sup>	1,83 ± 0,17 <sup>Bbc</sup>	2,54 ± 0,35 <sup>Bb</sup>	1,76 ± 0,14 <sup>Bc</sup>
30	2,72 ± 0,02 <sup>Cb</sup>	2,78 ± 0,06 <sup>Cb</sup>	3,78 ± 0,29 <sup>ABa</sup>	1,08 ± 0,06 <sup>Cd</sup>	1,42 ± 0,13 <sup>Cc</sup>	1,01 ± 0,03 <sup>Cd</sup>
60	2,51 ± 0,01 <sup>Db</sup>	2,53 ± 0,02 <sup>Db</sup>	3,41 ± 0,10 <sup>Ba</sup>	0,78 ± 0,02 <sup>Dd</sup>	1,16 ± 0,08 <sup>Cc</sup>	0,70 ± 0,03 <sup>Dd</sup>
120	2,29 ± 0,05 <sup>Eb</sup>	2,29 ± 0,06 <sup>Eb</sup>	3,24 ± 0,11 <sup>Ba</sup>	0,61 ± 0,01 <sup>DEc</sup>	0,63 ± 0,05 <sup>Dc</sup>	0,50 ± 0,08 <sup>Dc</sup>
180	2,17 ± 0,01 <sup>Fb</sup>	2,18 ± 0,01 <sup>EFb</sup>	3,26 ± 0,16 <sup>Ba</sup>	0,64 ± 0,01 <sup>DEc</sup>	0,47 ± 0,08 <sup>Dc</sup>	0,24 ± 0,07 <sup>Ed</sup>
240	2,09 ± 0,02 <sup>Fb</sup>	1,99 ± 0,02 <sup>Fb</sup>	3,39 ± 0,01 <sup>Ba</sup>	0,53 ± 0,05 <sup>Ec</sup>	0,5 ± 0,05 <sup>Dc</sup>	0,01 ± 0,09 <sup>Ed</sup>

Resultados expressos em média ± desvio padrão. Letras maiúsculas sobrescritas diferem entre si na mesma coluna com intervalo de confiança de 95%. Letras minúsculas sobrescritas diferem entre si na mesma linha com intervalo de confiança de 95%. Onde NH é sem tratamento térmico e HT é com tratamento térmico.

A partir da observação da Tabela 7, verifica-se que o tratamento térmico foi indispensável para a atividade de Alcalase, não foi significativo para a atividade de papaína e foi benéfico para a atividade de pepsina, embora não tenha sido indispensável para a ocorrência da hidrólise.

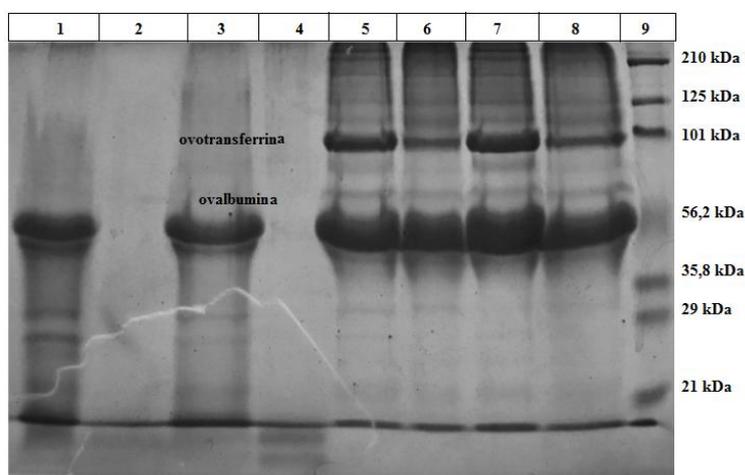
Em clara de ovos, o tratamento térmico anterior à hidrólise enzimática pode ter duas finalidades distintas: promover a destruição térmica de inibidores de proteases e promover a desnaturação de proteínas globulares, facilitando o acesso das enzimas às ligações peptídicas (MINE e ZHANG, 2013).

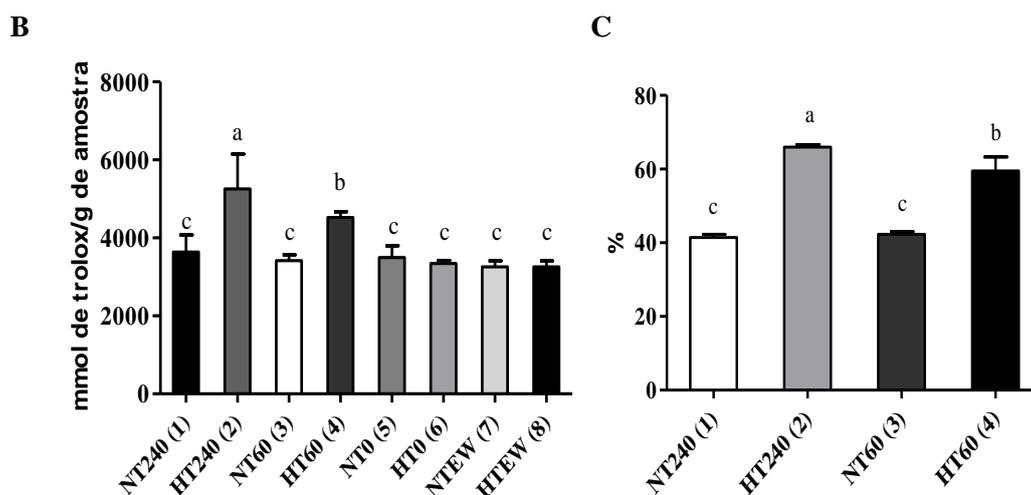
Ovos de galinha apresentam uma grande gama de inibidores de proteases e, entre eles, os principais são: ovomucoide, ovoinibidor e ovostatina, inibidores de serina-proteases, como a tripsina e as subtilisinas (Alcalase). Estão presentes ainda outros tipos de inibidores, como as cistatinas, específicas para cisteína-proteases como a papaína. No entanto, enquanto ovomucoide representa cerca de 10% de todas as proteínas da clara, a cistatina aparece em concentrações de cerca de 80 mg/mL de clara e, em contrapartida, enquanto ovomucoide pode ser inativada por tratamentos em temperatura de cerca de 80°C, cistatina depende de longos tempos em 100°C para completa inativação (SAXENA e TAYYABB, 1997; VAN DER PLANCKEN et al., 2004).

As Figuras 9, 10 e 11 mostram o SDS-PAGE (parte A), a capacidade antioxidante das amostras (HT - tratado termicamente) e controles e (NT - não tratado termicamente) avaliadas pela sua capacidade de sequestrar os radicais ABTSe expressos como equivalentes de Trolox (parte B) e o rendimento de hidrólise das amostras (parte C).

É possível observar que o tratamento a 90 °C por 10 min não induziu alterações visíveis no perfil protéico inicial das claras, com exceção da ovotransferrina. A banda correspondente mostrou uma redução parcial após o tratamento (Linhas 6 e 8), possivelmente relacionada à alta termossensibilidade desta proteína, que sofre desnaturação em temperaturas acima de 60 °C, enquanto a ovalbumina suporta temperaturas superiores a 75 °C (POWRIE e NAKAI , 1985). É também visível que, embora as amostras de clara de ovo apresentem alguma capacidade antioxidante, esta característica não foi significativamente afetada pelo tratamento térmico ou pelas condições de hidrólise na ausência de proteases (Linhas 5 a 8).

A





**Figura 9.** Hidrólise da clara de ovo em pó pela Alcalase. **A:** SDS-PAGE. Linha 1: amostra não tratada (NT) após hidrólise de 240 minutos; Linha 2: amostra tratada termicamente (HT) após 240 minutos de hidrólise; Linha 3: amostra não tratada termicamente (NT) após 60 minutos de hidrólise; Linha 4: amostra tratada termicamente (HT) após 60 minutos de hidrólise; Linha 5: amostra não tratada termicamente (NT), sem hidrólise; Linha 6: amostra tratada termicamente (HT), sem hidrólise; Linha 7: clara de ovo em pó não tratada termicamente (NTEW); Linha 8: clara de ovo em pó tratada termicamente (HTEW); Linha 9: Marcador de massa molecular. **B:** Capacidade antioxidante ABTS. Letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). **C:** Rendimento da hidrólise. Letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

As Linhas 1 e 3 da Figura 9A mostram que, mesmo após 60 e 240 min de hidrólise, a Alcalase® não foi capaz de hidrolisar significativamente a ovalbumina presente no meio de reação. Outras proteínas importantes, tais como a ovotransferrina, foram efetivamente hidrolisadas sem mostrar qualquer impacto detectável no decréscimo de proteína total (Tabela 7), rendimento de hidrólise ou capacidade antioxidante (Figura 9C e 9B, respectivamente). As Linhas 2 e 4 (Figura 9A) mostram que, após o tratamento térmico, a hidrólise da maioria das proteínas da clara de ovo pela Alcalase foi alcançada com sucesso. No entanto, a Linha 4 ilustra que, após um período mais curto de hidrólise (60 min), a amostra HT apresentou algumas frações visíveis de baixa massa molecular que desapareceram após 240 min (Linha 2). Este resultado indica que estes pequenos fragmentos proteicos foram adicionalmente hidrolisados para peptídeos de massa mais baixa, o que pode ter sido responsável pela maior capacidade antioxidante e rendimento do hidrolisado de HT240 (Figuras 9B e 9C).

Os efeitos positivos e indispensáveis do tratamento térmico sobre a atividade de Alcalase podem ser explicados pela possível presença de atividade inibidora de serina-protease no produto de clara comercial, pasteurizado e seco por *spray* usado como matéria-prima. Segundo GEVEKE e TORRES (2013), a pasteurização das claras é recomendada nas seguintes condições: 55,6 °C / 6,2 min ou 56,7 °C / 5,3 min. Este tratamento, embora

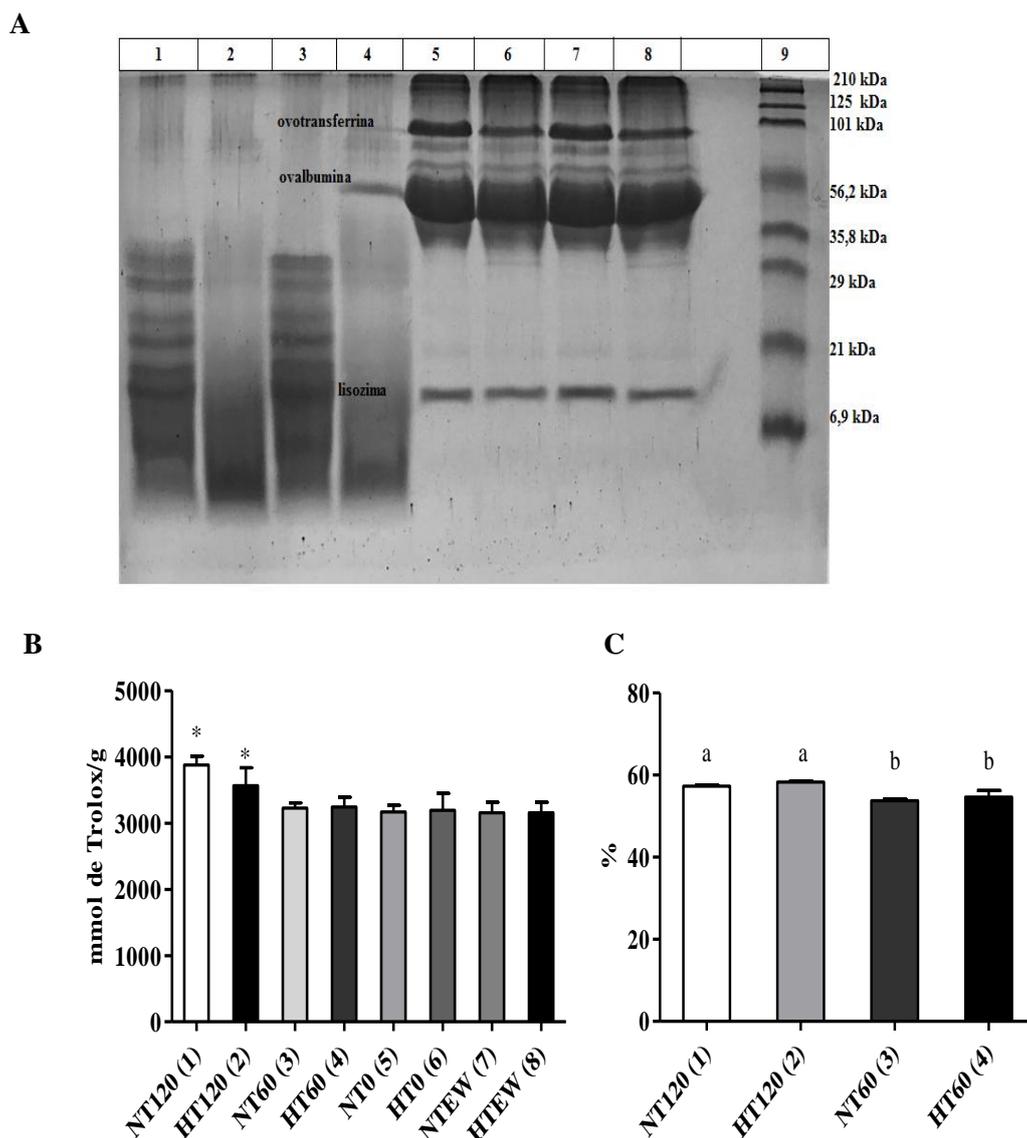
suficiente para garantir a segurança microbiana, não é suficiente para promover a inativação térmica dos principais inibidores da protease da clara do ovo.

Acredita-se que o processo de secagem por pulverização cause baixo dano térmico aos produtos que estão sendo secos. Enquanto o ar de secagem pode chegar a 190°C, há muito pouco tempo de contato com o produto, e o calor latente, que é necessário para a evaporação da água, promove o resfriamento das partículas sólidas (MA et al., 2013). Portanto, este processo não deve ser capaz de promover a inativação dos inibidores de protease presentes na clara do ovo. Assim, pode-se inferir que o tratamento térmico aplicado a 90 °C por 10 min foi eficiente para reduzir a atividade dos inibidores de serina-proteases presentes na matéria-prima, favorecendo significativamente a atividade da Alcalase.

Em um estudo sobre as mudanças induzidas pelo calor na suscetibilidade de proteínas de clara de ovo à hidrólise por tripsina, VAN DER PLANCKEN et al. (2003) ressaltaram que os tratamentos térmicos acima de 75 °C foram capazes de inativar a ovomucóide e o ovo-inibidor, possibilitando desta forma a tripsinização da clara de ovos. Segundo esses autores, quanto maior a temperatura aplicada, maior o grau de hidrólise, até 92 °C (a temperatura mais alta testada).

No entanto, CASTRO e SATO (2015) não relataram nenhum tratamento prévio para a hidrólise de clara de ovo fresca por três proteases microbianas, incluindo Alcalase. Neste trabalho, embora nem o grau de hidrólise nem o rendimento de peptídeos tenham sido avaliados, a hidrólise por Alcalase resultou no hidrolisado com menor atividade antioxidante, possivelmente por sua baixa especificidade para esta atividade.

Semelhante ao presente estudo, ABEYRATHNE et al. (2016) observaram que a Alcalase hidrolisou a ovomucina isolada sem tratamento térmico prévio e, em estudo anterior conduzido por ABEYRATHNE et al. (2014), a mesma enzima não foi capaz de hidrolisar significativamente a albumina purificada não tratada. As nossas descobertas corroboram também com as conclusões de VAN DER PLANCKEN et al. (2003), em que o tratamento térmico até 90 °C foi claramente benéfico para a atividade de serina-proteases, destruindo inibidores de serina-protease e desnaturando a estrutura da ovalbumina, aumentando assim a ação das proteases.



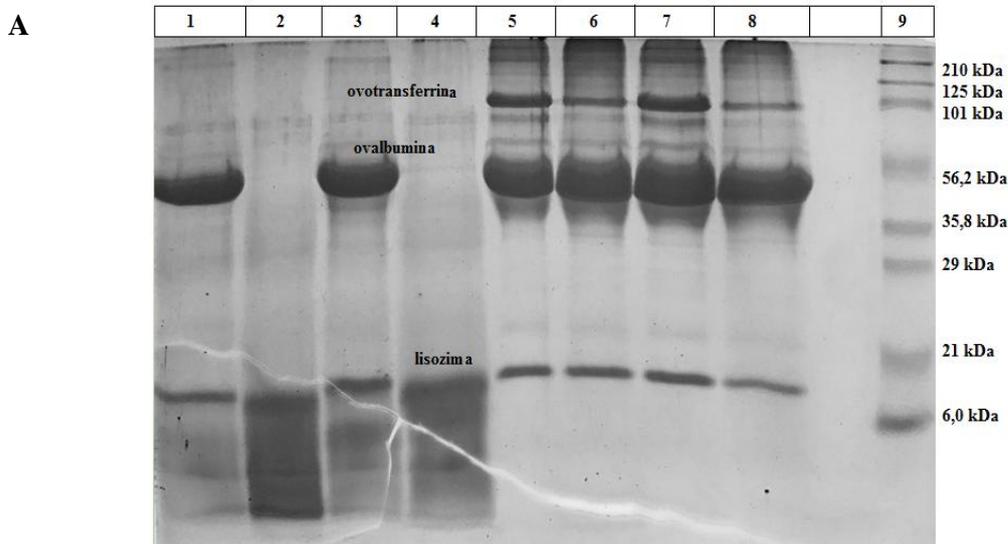
**Figura 10.** Hidrólise da clara de ovo em pó de papaína. **A:** SDS-PAGE. Linha 1: amostra não tratada termicamente (NT) após 120 minutos de hidrólise; Linha 2: amostra tratada termicamente (HT) após 120 minutos de hidrólise; Linha 3: amostra não tratada termicamente (NT) após 60 minutos de hidrólise; Linha 4: amostra tratada termicamente (HT) após 60 minutos de hidrólise; Linha 5: amostra não tratada termicamente (NT), sem hidrólise; Linha 6: amostra tratada termicamente (HT), sem hidrólise; Linha 7: clara de ovo em pó não tratada termicamente (NTEW); Linha 8: clara de ovo em pó tratada termicamente (HTEW); Linha 9: Marcador de massa molecular. **B:** Capacidade antioxidante ABTS. (\*) amostra é significativamente diferente ( $p < 0,05$ ). **C:** Rendimento de hidrólise. Letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

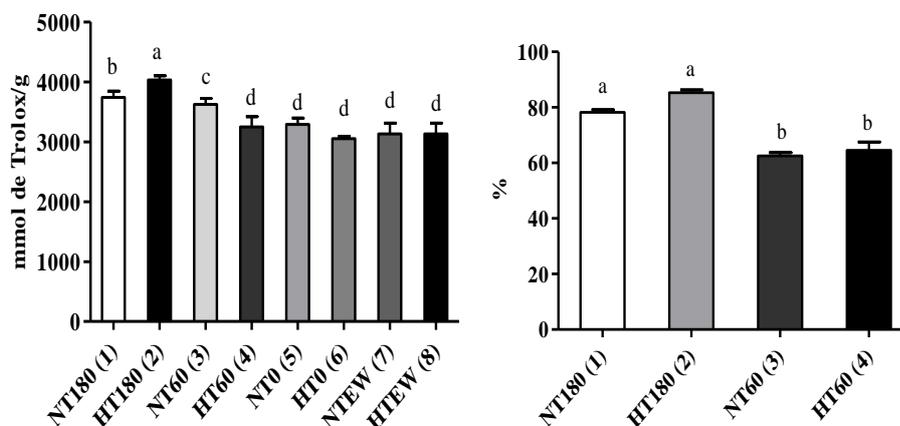
Embora o tratamento térmico não tenha influenciado a capacidade da papaína de reduzir a concentração inicial de proteínas no meio reacional (Tabela 7), a eficiência da hidrólise foi muito afetada, como pode ser observado nas Linhas 1 a 4 da Figura 10A. A hidrólise ocorreu independentemente do tratamento, mas o perfil dos produtos formados foi perceptivelmente diferente: após o tratamento térmico, a hidrólise gerou produtos de menor massa molecular. Este resultado, no entanto, não pareceu influenciar a capacidade

antioxidante dos hidrolisados; ambas as amostras (HT e NT) mostraram atividade antioxidante semelhante após 120 min de hidrólise.

A papaína, uma cisteína-protease, é pouco ou nada afetada pela presença dos inibidores de tripsina encontrados nas claras de ovos de galinha. A atividade da papaína também não foi significativamente afetada pela presença de cistatina, possivelmente devido à baixa concentração desse inibidor no meio reacional. CHEN et al. (2009) encontraram resultados semelhantes quando hidrolisaram claras de ovos de pata sem tratamento térmico prévio. Das várias proteases testadas, incluindo tripsina, Alcalase e Flavourzyme, somente a papaína foi capaz de realizar a hidrólise.

Apesar de ser uma cisteína-protease, a papaína apresenta especificidade semelhante à tripsina, preferindo hidrolisar as ligações que envolvem arginina e lisina (BRENDA, 2017). Assim, uma vez que a desnaturação térmica das proteínas da clara do ovo provou ser benéfica para a atividade da tripsina em VAN DER PLANCKEN et al. (2003), é possível que essa desnaturação tenha afetado de forma semelhante a atividade da papaína no presente estudo, o que poderia explicar a diferença no perfil peptídico apresentado pelo SDS-PAGE.



**B****C**

**Figura11.** Hidrólise da clara de ovo em pó pela pepsina. A: SDS-PAGE. Linha 1: amostra não tratada termicamente (NT) após 180 minutos de hidrólise; Linha 2: amostra tratada termicamente (HT) após 180 minutos de hidrólise; Linha 3: amostra não tratada termicamente (NT) após 60 minutos de hidrólise; Linha 4: amostra tratada termicamente (HT) após 60 minutos de hidrólise; Linha 5: amostra não tratada termicamente (NT), sem hidrólise; Linha 6: amostra tratada termicamente (HT), sem hidrólise; Linha 7: clara de ovo em pó não tratado termicamente (NTEW); Linha 8: clara de ovo em pó tratada termicamente (HTEW); Linha 9: Marcador de massa molecular. B: Capacidade antioxidante ABTS. Letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). C: Rendimento da hidrólise. Letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

A Figura 11A ilustra que a pepsina foi capaz de hidrolisar todas as proteínas de clara de ovo na ausência de tratamento térmico, exceto ovalbumina e lisozima (Linhas 1 e 3), e que o tratamento térmico permitiu a hidrólise completa da ovalbumina presente após os primeiros 60 min de reação (Linha 4). Isto não pareceu interferir no rendimento da hidrólise, que mostrou ser dependente do tempo e foi apenas ligeiramente, não significativamente, maior depois do tratamento térmico. O efeito do tratamento térmico sobre a capacidade antioxidante não foi consistente: após 60 min de hidrólise, o tratamento térmico aparentemente prejudicou o desenvolvimento dessa capacidade no hidrolisado, mas após 180 min, o tratamento demonstrou-se benéfico.

A atividade da pepsina foi significativamente afetada pelo tratamento térmico. No entanto, ao contrário de quando Alcalase foi testada, a hidrólise de proteínas de clara de ovo pela pepsina ocorreu mesmo nas amostras sem tratamento (Tabela 7), o que sugere a existência de um mecanismo de influência diferente dos inibidores de protease. Além disso, embora haja menção de inibidores de clara de ovo para todas as classes de proteases (ovomacroglobulina) na literatura (SAXENA & TAYYABB, 1997), nenhum detalhe é relatado sobre inibidores específicos de protease aspártica, como a pepsina. A proteína

mais presente na clara do ovo é a ovalbumina, que corresponde a mais de 50% das proteínas. Esta proteína apresenta uma estrutura globular fortemente compactada composta mais da metade por aminoácidos hidrofóbicos, que são protegidos principalmente dentro desta estrutura globular (ZHAO et al., 2016; SHENG et al., 2018). A pepsina é uma protease aspártica que exibe baixa especificidade, mas tem alta afinidade por aminoácidos hidrofóbicos (BRENDA, 2017). A desnaturação térmica das proteínas leva ao desdobramento de suas estruturas e expõe diferentes sítios de clivagem para as enzimas durante a hidrólise (VAN DER PLANCKEN et al., 2003); assim, é possível inferir que o tratamento térmico foi responsável pela desnaturação das proteínas nas claras, causando alterações na estrutura da ovalbumina e facilitando o acesso da pepsina às ligações peptídicas no interior das moléculas (envolvendo aminoácidos hidrofóbicos), que favoreceu a eficiência da hidrólise. WANG et al. (2017), além dos efeitos do aquecimento sobre a pó de clara de ovo, verificaram o aumento da exposição dos resíduos hidrofóbicos, analisando a hidrofobicidade da superfície e destacaram como o aquecimento expunha mais locais de atividade de pepsina na superfície da proteína. ABEYRATHNE et al. (2014, 2015, 2016), no entanto, não encontrou dificuldade em hidrolisar com pepsina as proteínas isoladas ovalbumina, ovomucóide e ovomucina ausência de tratamento térmico.

Segundo JOVANOVIĆ et al. (2016), o uso do tratamento térmico antes da hidrólise enzimática é recomendado para aumentar a suscetibilidade das proteínas de clara de ovo às ações de diferentes proteases. No entanto, a aplicação de calor é frequentemente associada a efeitos negativos, como alterações na solubilidade e na cor (STEFANOVIĆ et al., 2014). Consequentemente, diferentes métodos de pré-tratamento já foram testados para substituir o uso de calor como um método de tratamento pré-hidrólise de proteínas de clara de ovo (LEI et al., 2011; WANG et al., 2013). Embora vários tratamentos, especialmente o uso de ultrassom (JOVANOVIĆ et al., 2016) e campos elétricos pulsados (LIU et al., 2017), tenham sido eficientes em permitir a hidrólise das proteínas de clara de ovo por diferentes proteases, quando comparados a tratamentos térmicos (em temperaturas superiores a 80 °C), os tratamentos alternativos apresentaram, no máximo, eficiência semelhante ao tratamento térmico. Se o custo mais baixo e a facilidade de aplicação (por exemplo, usando equipamentos já instalados nas indústrias) forem levados em consideração, o tratamento térmico ainda é a melhor opção e, portanto, é importante entender melhor seus efeitos sobre a hidrólise do clara de ovo por diferentes proteases.

De um modo geral o tratamento térmico não foi prejudicial à hidrólise enzimática, pelo contrário, mostrou-se benéfico para enzimas como no caso da Alcalase e não afetou negativamente as enzimas pepsina e papaína. Por este motivo o tratamento térmico foi selecionado para as próximas etapas como tratamento prévio a hidrólise.

## 5.2 RENDIMENTO DE HIDRÓLISE

Tabela 8. Rendimento de hidrólise ao longo do tempo

Tempo (min)	Rendimento de hidrólise (%)		
	Alcalase	Papaína	Pepsina
30	57,53 ± 5,16 <sup>Ca</sup>	42,49 ± 3,82 <sup>Da</sup>	43,66 ± 8,65 <sup>Da</sup>
60	59,62 ± 3,76 <sup>Ca</sup>	54,64 ± 1,61 <sup>Cb</sup>	64,58 ± 2,98 <sup>Ca</sup>
120	58,48 ± 0,92 <sup>Cb</sup>	58,31 ± 0,90 <sup>CBb</sup>	73,97 ± 4,81 <sup>CBa</sup>
180	63,75 ± 1,22 <sup>BCb</sup>	60,36 ± 0,32 <sup>ABc</sup>	85,25 ± 1,05 <sup>ABa</sup>
240	65,99 ± 0,63 <sup>Ab</sup>	61,32 ± 0,70 <sup>ABc</sup>	84,49 ± 0,98 <sup>ABa</sup>
300	73,20 ± 1,75 <sup>Ab</sup>	60,74 ± 0,60 <sup>ABc</sup>	87,06 ± 1,94 <sup>ABa</sup>
360	69,95 ± 4,53 <sup>ABb</sup>	64,81 ± 1,60 <sup>Ab</sup>	88,89 ± 4,36 <sup>Aa</sup>

Resultados expressos em média ± desvio padrão. Letras maiúsculas sobrescritas diferem entre si na mesma coluna com intervalo de confiança de 95%. Letras minúsculas sobrescritas diferem entre si na mesma linha com intervalo de confiança de 95%. (Teste Two-way ANOVA seguido de pós teste de Bonferroni)

Pela observação da Tabela 8 é possível verificar que comparando as três enzimas testadas em relação ao rendimento e tempo de hidrólise, a pepsina atingiu o maior rendimento (85,3%) no menor tempo (180 min); a Alcalase produziu um rendimento menor (65,9%) e necessitou de um tempo de reação muito mais longo (240 min), enquanto a aplicação de papaína resultou no menor rendimento de hidrólise (58,3%) de maneira independente do tempo. Em particular, a hidrólise pela papaína atingiu seu valor máximo após 120 min de reação e não se alterou, mesmo após o dobro do tempo.

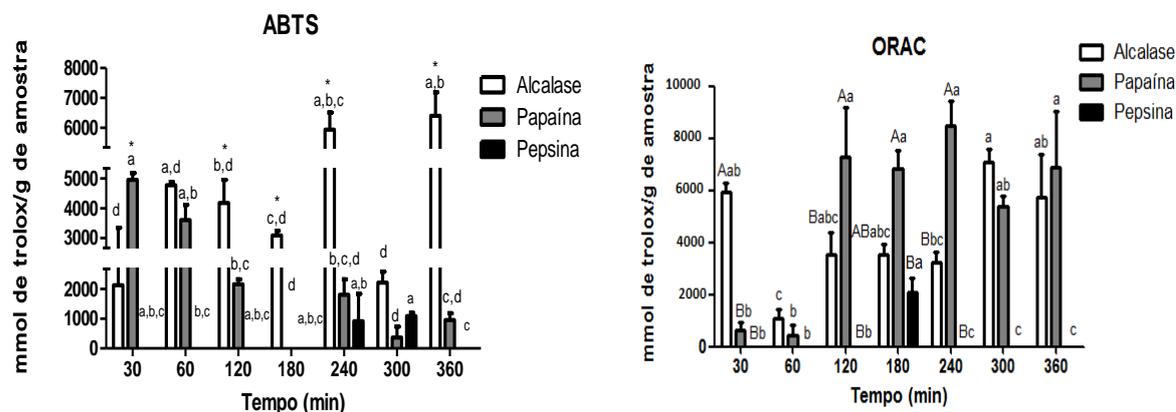
Este comportamento em relação ao rendimento era esperado, pois a papaína é a mais específica das três enzimas testadas, o que significa que, após a hidrólise das ligações reconhecíveis na estrutura primária de um substrato, esta enzima não deve ser capaz de hidrolisá-lo ainda mais. O comportamento da Alcalase também foi o esperado. Como uma enzima de baixa especificidade, uma vez livre de inibidores específicos, a Alcalase deve ser capaz de hidrolisar as várias proteínas diferentes da clara do ovo em peptídeos de baixa massa

molecular. O comportamento da pepsina, no entanto, foi um pouco inesperado. Esta enzima é considerada de baixa especificidade e tende a ser menos efetiva que a Alcalase com relação ao rendimento (SHAZLY et al., 2019). Neste caso, o maior rendimento e a hidrólise mais rápida conseguidos pela utilização da pepsina podem ser creditados à presença predominante de ligações peptídicas susceptíveis à hidrólise por esta enzima (envolvendo aminoácidos hidrofóbicos) nas proteínas mais abundantes da clara de ovo (especialmente albuminas)(BRENDA, 2017). Outros estudos também apontaram para a maior eficiência da pepsina em obter altos rendimentos de hidrólise de proteínas do ovo isoladas quando comparadas à Alcalase (ou outras subtilisinas) e à tripsina, que é uma enzima com especificidade semelhante a da papaína (HIIDENHOVI et al., 2005; NOH e SUH, 2015, HORIMOTO e LIM, 2017).

### 5.3 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

Para uma avaliação completa e acurada da capacidade antioxidante de uma substância ou mistura de substâncias é recomendado o uso de pelo menos dois métodos analíticos de modo a proporcionar informação abrangente sobre a atividade da amostra em questão, considerando os prós e os contras de cada método e também a sua aplicabilidade. Não há ainda um método universal pelo qual a atividade antioxidante possa ser medida precisamente e quantitativamente, devido aos diversos tipos de radicais, aos diferentes alvos de oxidação e especialmente às diferentes formas de atuação dos antioxidantes (PÉREZ-JIMENEZ, 2008). Um teste adequado deve analisar compostos químicos que estão presentes naturalmente, utilizar uma fonte de radical relevante biologicamente, ter um mecanismo químico definido, instrumentação disponível e adaptável para ensaios de antioxidantes lipofílicos e hidrofílicos (PRIOR, WU e SCHAICH, 2005). Segundo NIMALATNE et al. (2015) os métodos ORAC e ABTS são bons métodos para detecção do potencial antioxidante de peptídeos obtidos por hidrólise enzimática.

A atividade antioxidante dos hidrolisados foi determinada pelos métodos do sequestro do radical ABTS e ORAC e os resultados estão apresentados na Figura 12.



Letras minúsculas diferem a mesma amostra entre os tempos com intervalo de confiança de 95% (One-way ANOVA seguido de pós teste de Tukey). (\*) Amostras diferem entre si no mesmo tempo com intervalo de 95% de confiança (Two-way ANOVA seguido de pós teste de Bonferroni).

Letras minúsculas diferem entre os tempos com intervalo de confiança de 95% (One-way ANOVA seguido de pós teste de Tukey). Letras maiúsculas diferem entre si no mesmo tempo com intervalo de 95% de confiança (Two-way ANOVA seguido de pós teste de Bonferroni).

Figura 12. Atividade antioxidante determinada pelo método de ABTS e ORAC nas amostras de hidrolisado de clara de ovo pelas enzimas Alcalase, papaína e pepsina ao longo do tempo.

A partir da Figura 12 é possível observar que em ambos os métodos os hidrolisados pela Alcalase demonstraram ter a sua atividade aumentada ao longo do tempo de hidrólise, isso pode ser explicado pela capacidade dessa enzima em formar pequenos peptídeos com capacidade antioxidante ao longo do tempo de digestão. REN et al. (2014) e SHAZLY et al. (2019) apontaram a Alcalase como uma excelente enzima para a obtenção de peptídeos com alta capacidade antioxidante. Essa característica tem sido atribuída à baixa especificidade da Alcalase, que é capaz de produzir peptídeos de baixa massa molecular (SHAZLY et al., 2019; LIU et al., 2015), que tem sido considerada uma característica importante no componente peptídico dos hidrolisados com alta atividade antioxidante (GUO et al., 2009; NIMALARANTE et al., 2015).

Embora isso possa ser considerado verdadeiro para os hidrolisados obtidos com Alcalase (Figuras 9A e 9B), este resultado não se repetiu para os hidrolisados obtidos com papaína ou pepsina. Na Figura 12 o método de ABTS apontou para diminuição da atividade dos hidrolisados de papaína ao longo do tempo de digestão, enquanto que para o ORAC, a atividade antioxidante aumentou ao longo do tempo. Isso pode ser explicado possivelmente

porque o método de ABTS foi mais sensível aos peptídeos maiores gerados inicialmente (Figura 10A) e que o ORAC foi mais sensível aos peptídeos menores que foram gerados após tempos maiores tempos de reação. E que ainda, os peptídeos maiores inicialmente formados pela papaína apresentaram mais atividade do que os menores formados nos últimos tempos e foram detectados predominantemente pelo ORAC, por este ser um método mais sensível em relação ao ABTS. GRASZKIEWICZ et al. (2010) reportaram que o precipitado proteico da clara do ovo foi hidrolisado com tripsina e quimotripsina. Embora os menores peptídeos tenham sido obtidos com quimotripsina, a maior atividade antioxidante foi detectada no hidrolisado produzido com tripsina. Como em SUN et al. (2014), o hidrolisado de clara de ovo obtido com pepsina foi fracionado em quatro frações de acordo com a massa molecular dos peptídeos obtidos, e a fração com maior atividade antioxidante continha o peptídeos com a segunda maior massa entre as frações.

CHEN e colaboradores (2012) afirmaram que quanto ao grau e o tempo de hidrólise é possível observar que as propriedades bioativas dos hidrolisados protéicos são altamente dependentes de suas sequências e composições de aminoácidos e que a hidrólise da proteína da clara do ovo pode dar origem tanto à liberação de sequências aminoacídicas com propriedades bioativas quanto à exposição de resíduos de aminoácidos ocultos e cadeias laterais com potencial antioxidante. Esses autores realizaram um estudo analisando a hidrólise da clara de ovo pela tripsina, e associaram de maneira diretamente proporcional o aumento do grau de hidrólise ao aumento das propriedades bioativas, principalmente a antioxidante e a capacidade inibidora da ECA I, contudo neste presente trabalho esta observação não se aplicou a todas as enzimas utilizadas.

Em outro estudo utilizando tripsina, papaína, Flavourzyme, Alcalase e Neutrase durante 5 horas de reação, sobre clara de ovo, CHEN et al. (2011) apontaram para a papaína como a enzima que gerou o hidrolisado com o maior potencial, cerca 80% de redução, frente a 70% de redução dos hidrolisados por Alcalase e as demais, neste caso o método utilizado foi o de sequestro do radical de DPPH.

Os hidrolisados pela pepsina apresentaram atividades menores com relação aos demais hidrolisados em ambos os métodos. Os tempos com melhor atividade para esses hidrolisados foram 180 min para o ORAC, e 240 min para o método de ABTS. YOU e WU (2011) em um trabalho utilizando as enzimas pepsina, pancreatina, termolisina e Alcalase para hidrolisar clara de ovo por 3 horas, tiveram como resultado da avaliação da capacidade antioxidante,

utilizando o método de ORAC, a pepsina com potencial superior ao da Alcalase. Porém nos seus resultados de ABTS o potencial da Alcalase foi ligeiramente superior ao da pepsina, contudo não diferiu significativamente. Segundo os mesmos autores uma das possíveis explicações é a possibilidade da pepsina formar muitos compostos hidrofóbicos devido a sua especificidade e como o método de ABTS tem maior afinidade por compostos hidrofílicos este não foi capaz de avaliar o seu real potencial.

A principal vantagem do método do sequestro do radical ABTS consiste na sua relativa simplicidade. O valor TEAC caracteriza a capacidade da amostra testada em reagir com radical ABTS, bem como em inibir processos oxidativos. O resultado da determinação do TEAC é diretamente dependente do tempo de incubação assim como a concentração da amostra quantificada (EVANS et al., 1996). Esta dependência somada a pouca seletividade do ABTS.+ na reação com átomos doadores de hidrogênio constituem uma limitação importante desse método (CAMPOS, 1997). Deste modo, divergências nos resultados de TEAC podem ser atribuídas a fatores limitantes como a diferença no tempo de incubação ou na estratégia de obtenção de ABTS (BORGES et al., 2011).

O método de ORAC é considerado um método moderno com capacidade de avaliar substâncias tanto lipofílicas quanto hidrofílicas. Devido ao seu mecanismo de reação, impede que fatores externos à análise interfiram na metodologia e por isso é considerado um método mais sensível que os demais métodos. Uma das principais vantagens é o uso de radicais peroxila ou hidroxila como pró-oxidantes, conferindo maior significado biológico frente aos métodos que usam oxidantes não encontrados normalmente em sistemas biológicos, como alimentos ou seres vivos (SUCUPIRA et al.,2015).

Neste sentido os resultados corroboram para a hipótese, segundo os trabalhos encontrados na literatura, de que cada método possui sua especificidade e o hidrolisado produzido por cada enzima apresenta um comportamento diferente frente a cada ensaio adotado. É possível ainda que um mesmo hidrolisado apresente potenciais antioxidantes diferentes dependendo do método de avaliação aplicado, por isso, reforça-se a necessidade de mais de um método de avaliação desta característica bioativa e que outros fatores sejam associados para que se possa escolher a melhor enzima para a obtenção de hidrolisados com a atribuição desejada.

## 5.4 SECAGEM DAS AMOSTRAS

Para a etapa de secagem dos hidrolisados foram selecionados os hidrolisados obtidos pela Papaína e Alcalase nos tempos 120 e 240, respectivamente, por apresentarem os melhores resultados da capacidade antioxidante e rendimento. Como o objetivo principal do trabalho foi a análise antioxidante, os hidrolisados obtidos pela pepsina não foram considerados para as próximas etapas, por apresentarem baixos valores da capacidade antioxidante, em relação aos demais hidrolisados, apesar de ter apresentado o melhor resultado em rendimento.

Tabela 9. Rendimento da amostra pós-secagem.

<b>Método de Secagem</b>	<b>Papaína (%)</b>	<b>Alcalase (%)</b>
<b>Liofilização</b>	64.00 ± 2.31	65.87 ± 0.96
<b>Spray Dyer</b>	72.67 ± 1.76*	82.40 ± 1.22**

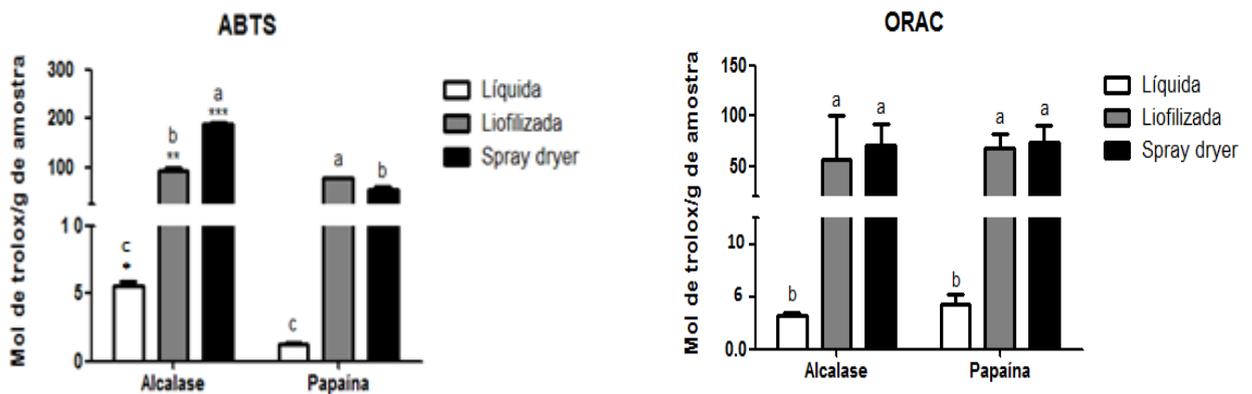
Resultados expressos em média ± desvio padrão. (\*) Médias diferem entre os métodos de secagem na mesma coluna com intervalo de 95% de confiança. (\*\*) Médias diferem entre os métodos de secagem na mesma coluna com intervalo de 99% de confiança. (Teste t de Student

A partir da Tabela 9 pode-se observar que o método de secagem por *spray dryer* apresentou o melhor rendimento em comparação ao método de liofilização para os hidrolisados obtidos pelas duas enzimas, demonstrando esta vantagem em relação ao outro método. Um dos motivos principais para perda de massa pós-secagem é na recuperação do material que está sendo seco, perde-se quantidades importantes durante o processo de secagem, nos recipientes ou até mesmo no próprio equipamento. Além disso, o método de *spray dryer* mostrou-se muito mais rápido em comparação ao outro método, durando em torno de 3-4 horas contra 48 horas de liofilização. SANTO et al. (2013) relataram também esse achado quanto à diminuição do percentual de recuperação da amostra pós-secagem, relatando a perda de material durante a secagem devido à adesividade das amostras nos tubos dos equipamentos, e a vantagem em relação ao tempo de secagem. Com relação à diferença de rendimento entre os métodos de secagem, uma das hipóteses a ser levantada é a densidade

das partículas formadas nos processos. RATTI et al. (2008) propõem sobre a leveza característica do material seco por liofilização, o alto poder higroscópico e baixa densidade, portanto podemos inferir que as amostras liofilizadas seriam mais leves que as amostras secas por *spray dryer* e apresentariam volumes diferentes alterando assim o seu rendimento.

O *spray drying* é uma técnica bem estabelecida para obtenção de produtos desidratados em pó, envolvendo evaporação rápida de água de um líquido atomizado alimentado em uma câmara. O ar quente flui dentro da câmara em uma contracorrente, evaporando a água das partículas atomizadas e transformando um produto aquoso em um produto em pó desidratado. A secagem por pulverização é vantajosa em termos de produzir pós de fluxo livre com uma faixa de controle de tamanho de partícula e uma taxa de secagem rápida, além disso o menor custo de instalação e operação deste processo em relação à liofilização também podem ser considerados como uma vantagem (BHANDARI et al., 2008). A liofilização, por outro lado, aborda diretamente o desafio de preservar componentes lábeis ao calor. No processo de liofilização, o material é primeiro congelado a uma temperatura baixa, formando cristais de gelo. Estes cristais são sublimados do estado sólido diretamente para a fase de vapor em uma câmara de vácuo (LIU, ZHAO e FENG, 2008) em um processo conhecido como secagem primária. O pré-requisito para a sublimação é que a pressão de vapor e a temperatura devem ser controlados (MUMENTHALER e LEUENBERGER, 1991). A água adsorvida, que permanece na matriz de soluto é então reduzida por dessorção (secagem secundária) (LIAPIS e BRUTTINI, 2009). Estruturas porosas são formadas pela sublimação de cristais de gelo que levam a um comportamento de reidratação muito bom do produto em pó. A partícula liofilizada geralmente tem uma alta qualidade, mas a secagem longa, a natureza do lote, baixas temperaturas, alto vácuo e o alto custo operacional resultante limitam o uso da técnica de liofilização (LOPEZ-QUIROGA, ANTELO e ALONSO, 2012; ISHWARYA et al, 2015).

As análises de atividade antioxidante das amostras secas mostraram que o processo de secagem aumentou a capacidade antioxidante das duas amostras nos dois métodos de avaliação, como pode ser observado na Figura 20. Isso pode ser explicado devido à capacidade dos métodos concentrarem mais os compostos das amostras, favorecendo dessa forma maiores interações entre si e maior biodisponibilidade para interações com outros compostos quando incorporados a outras matérias (ISHWARYA et al, 2015).



Letras minúsculas diferem entre os métodos de secagem na mesma enzima com intervalo de 95% de confiança. (\*) Mesmo método de secagem difere entre as enzimas com intervalo de 95% de confiança (\*\*). Mesmo método de secagem difere entre as enzimas com intervalo de 99% de confiança. (\*\*\*) Mesmo método de secagem difere entre as enzimas com intervalo de 99,9% de confiança. (Two-way ANOVA seguido de pós teste de Bonferroni)

Letras minúsculas diferem entre os métodos de secagem na mesma enzima com intervalo de 95% de confiança. (Two-way ANOVA seguido de pós teste de Bonferroni. Não houve diferença significativa no mesmo método de secagem entre as enzimas.

Figura 13. Análise de capacidade antioxidante pelos métodos de ABTS e ORAC nos hidrolisados obtidos por Alcalase e papaina, secos por diferentes métodos.

A partir da Figura 13 também é possível observar que a liofilização foi inferior ao método de secagem por *spray dryer* isso com relação à capacidade de incrementar a atividade antioxidante avaliada pelo método de ABTS. Para o método ORAC não houve diferença significativa entre as formas de secagem. Esse aumento de atividade pela secagem por *spray dryer* superior ao método de liofilização não era esperado, pois segundo ISHWARYA et al (2015) o método de liofilização tende a preservar mais as características do produto que o método de *spray dryer*, isso deve-se as temperaturas utilizadas nos métodos de secagem, uma vez que o calor é capaz de provocar mais alterações em compostos, especialmente os termolábeis, como algumas proteínas. Deste modo poderia se esperar a perda de alguma capacidade ou a alteração durante a secagem e que a liofilização seria mais benéfica do que o outro método, contudo não foi isso o encontrado.

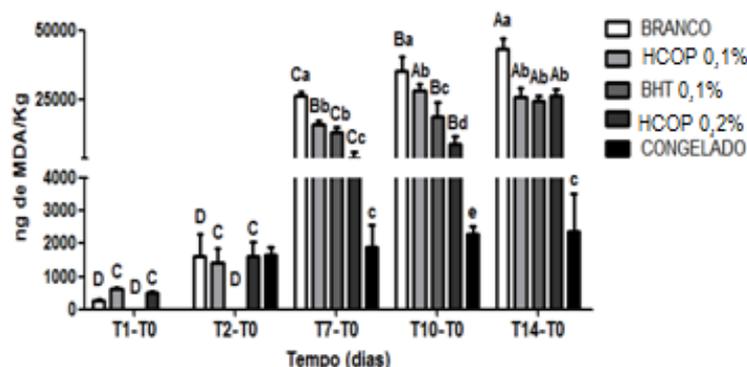
CHEN et al., (2011) explicam que a secagem por pulverização induz à desnaturação térmica e pode alterar as interações proteína-proteína, hidrofóbicas, eletrostáticas, ligação de hidrogênio e interações dissulfeto-sulfidríla, que podem afetar a atividade antioxidante

dohidrolisado proteico. Contudo pela secagem por pulverização ter tempo de permanência muito curto, e o pó e as partículas serem submetidas a condições de secagem por muito curtotempo, aparentemente isso não teve efeito prejudicial sobre a atividade antioxidante. Entretanto nesse mesmo estudo, que utilizou a papaína para hidrolisar a clara de ovo por 3 horas, os autores não identificaram nenhuma diferença significativa no potencial antioxidante dos hidrolisado secos por liofilização, *spray dryere* não seco.

Com relação ao hidrolisado com maior potencial antioxidante, verifica-se que o hidrolisado de Alcalase seco por *spray dryer* obteve melhor resultado em comparação aos demais, isso quando analisado pelo método ABTS, contudo no ORAC não houve diferença significativa (Figura 13). Esse resultado corrobora com os mesmos resultados das amostras antes de serem secas pelas diferentes metodologias, onde já apontava haver diferença significativa pelo método de ABTS e não haver diferença significativa entre as amostras pelo método de ORAC, e pode ser explicando que a secagem simplesmente aumentou (concentrou) a atividade antioxidante que foi identificada pelos métodos de acordo com a sua sensibilidade já discutida com relação a cada hidrolisado

De acordo com os resultados obtidos é possível observar que o *spray dryer* foi capaz de melhorar o resultado antioxidante dos hidrolisados em relação a liofilização. Além de ser um método mais vantajoso em todos os sentidos práticos e econômicos, indicando ser um bom método de desidratação para os hidrolisados aqui testados. Portanto, por ser observado que o melhor método de secagem foi o *spray dryere* o hidrolisado com maior capacidade antioxidante foi o da Alcalase, apesar de não ter tido diferença pelo método de ORAC, este foi o hidrolisado escolhido para dar prosseguimento às etapas do estudo.

## 5.5 APLICAÇÃO DO HIDROLISADO EM MODELO DE ALIMENTO

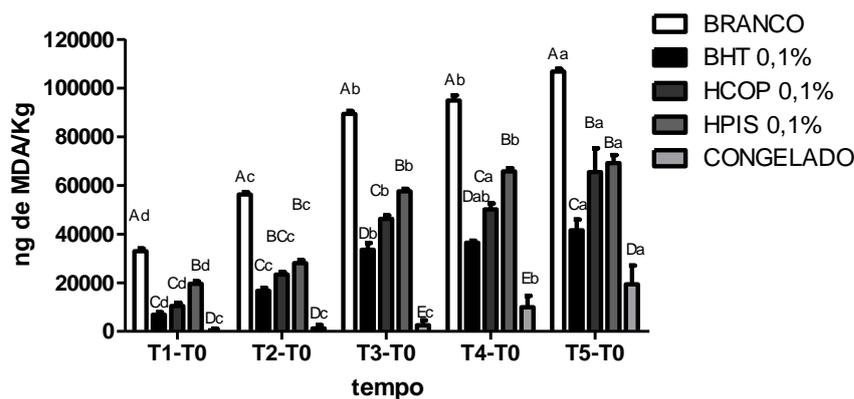


Letras maiúsculas diferem a mesma amostra entre os tempos com intervalo de 95% de confiança. Letras minúsculas diferem entre as amostras no mesmo tempo com intervalo de 95% de confiança (Two-way ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni).

Figura 14. Determinação da peroxidação pela quantificação colorimétrica de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico expressas em equivalentes de malonaldeído (EqM) no homogenato de frango utilizando a amostra seca por *spray dryer* obtida da Alcalase

A partir da Figura 14 é possível observar que inicialmente (1 e 2 dias) as amostras apresentaram a mesma oxidação inicial o que contribuiu para demonstrar que a presença ou ausência de antioxidantes foi capaz de alterar o teor de substâncias reativas formadas ao longo do tempo. O congelamento foi o melhor método de conservação, não apresentando diferença significativa entre os tempos, isso pode ser explicado porque temperaturas muito inferiores são capazes de retardar eficientemente diversas reações de deterioração dos alimentos (ORDOÑEZ, 2005).

Também é possível observar que os hidrolisados foram capazes de retardar a formação de substâncias reativas semelhante ao antioxidante padrão utilizado, indicando sua possibilidade e eficiência na aplicação para conservação deste tipo de alimento. Resultados semelhantes foram encontrados no estudo de ZHAO et al. (2014) que verificou a capacidade de hidrolisados obtidos de rejeitos de chá em retardar a oxidação lipídica de processados de frango. Esses autores encontraram resultados melhores do que o BHT (0,01% e 0,02%) nas concentrações de 0,5 e 1% do seu hidrolisado nos seis dias de armazenamento.



Letras maiúsculas diferem entre as tratamentos no mesmo tempo. Letras minúsculas diferem o mesmo tratamento entre os tempos. Intervalo de confiança de 95%. (Two-way ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni)

Figura 15. Determinação da peroxidação pela quantificação colorimétrica de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico expressas em equivalentes de malonaldeído (EqM) no homogenato de peixe utilizando a amostra seca por *spray dryer* obtida da Alcalase.

A oxidação inicial do homogenato de peixe (Figura 15) se comportou de maneira semelhante ao homogenato de frango. O método de congelamento também demonstrou ser o melhor método para conservação do produto. O uso de hidrolisados protéicos de soja e de ovo, em concentrações iguais às do BHT, foi capaz de evitar em parte a peroxidação dos lipídeos do homogenato de peixe, sugerindo esses hidrolisados como eficientes alternativas naturais a esse antioxidante sintético. Esses resultados corroboram os resultados positivos sobre o potencial dos peptídeos na aplicação de alimentos como os encontrados por LI et al (2013), que verificaram até o sexto dia de armazenamento os hidrolisados de pele de peixe aplicados em filés de peixe foram capazes de manter o teor de equivalente de malonaldeído inferior ao do controle, contudo, nesse estudo não foi utilizado um antioxidante sintético como controle.

BAI et al. (2017) verificaram a eficiência de hidrolisados de peixe sobre hambúrgueres de carne de porco e observaram que pequenas quantidades (inferiores a 1%) do seu hidrolisado não foram tão eficientes, apresentando valores próximos ao do controle refrigerado, sem nenhuma adição de antioxidantes. Os peptídeos também podem ser incorporados aos óleos como, por exemplo, no estudo realizado por MEMARPOOR-YAZDI et al. (2012), que apontaram uma boa atividade de peptídeos obtidos da hidrólise de clara de ovo por papaína no combate a peroxidação de ácido linoléico. CHEN et al. (2012)

propõem que, além de agirem como sequestradores de radicais livres, os hidrolisados protéicos antioxidantes servem como protetores de membrana, formando uma proteção (barreira) em torno de gotículas lipídicas contra iniciadores de oxidação.

Em produtos cárneos e em carnes em geral, existem várias abordagens para controlar a oxidação lipídica. Entre estes, a aplicação de antioxidantes com objetivo de retardar a taxa de oxidação nesses alimentos é considerada como uma escolha pragmática (KETNAWA et al., 2016). Segundo SOHAIB et al. (2016), em produtos cárneos os peptídeos antioxidantes auxiliam na proteção contra danos causados por estresse oxidativo através da ligação de íons metálicos, eliminação de superóxido ou via regeneração de vários antioxidantes. Um dos métodos mais eficientes para evitar a oxidação lipídica em carne ou produtos cárneos é incorporar proteínas antioxidantes que trabalham por diversos mecanismos, incluindo controle de pró-oxidantes, controle de substratos de oxidação e de radicais livres.

Outro ponto a ser observado é a diferença no teor de compostos formados nos homogenatos de peixe e frango e o tempo da sua avaliação. Enquanto os valores de equivalentes de malonaldeído não chegaram a 50.000 em 14 dias de armazenamento do homogenato de frango, no homogenato de peixe este valor foi superado pela amostra sem conservante logo no segundo dia de análise. Como consequência, o produto de frango precisou de mais tempo para ser avaliado do que o de peixe. Esses fatores estão diretamente ligados à composição de cada amostra e a sua perecibilidade. A sardinha é um alimento rico em ácidos graxos poli-insaturados, portanto mais propenso a oxidação lipídica. Também é importante salientar que, apesar da máxima assepsia no preparo das amostras, o peixe possui uma alta carga microbiana e sua carne estava mais em contato com as vísceras que possuíam enzimas digestivas que poderiam facilitar o processo de deterioração (ÓRDOÑEZ, 2005).

JIANG e XIONG (2016) reforçam sobre a busca e importância da utilização de antioxidantes naturais em alimentos como substitutos aos sintéticos. Declaram ainda que os peptídeos, como por exemplo os de ovos, possuem grande potencial antioxidante e que deve ser estimulada sua incorporação em alimentos de origem animal (produtos cárneos) e ressaltam a necessidade do desenvolvimento e aprimoramento de maiores estudos nesse sentido.

## 5.6 AVALIAÇÃO *IN SILICO*

Tabela 10. Comparação dos rendimentos de hidrólise

	Alcalase ( <i>in vitro</i> )	Alcalase ( <i>in silico</i> )	Papaína ( <i>in vitro</i> )	Papaína ( <i>in silico</i> )	Pepsina ( <i>in vitro</i> )	Pepsina ( <i>in silico</i> )
<b>Rendimento (%)</b>	69,95 ± 4,53 <sup>b</sup>	43,49 ± 3,00 <sup>c</sup>	64,81 ± 1,60 <sup>b</sup>	11,34 ± 1,0 <sup>d</sup>	88,89 ± 4,36 <sup>a</sup>	9,52 ± 1,0 <sup>d</sup>

Resultados expressos em média ± desvio padrão. Letras minúsculas sobrescritas diferem entre si na mesma linha com intervalo de confiança de 95%. (Teste Two-way ANOVA seguido de pós teste de Bonferroni)

Diferentemente dos resultados *in vitro* a hidrólise *in silico* apontou a Alcalase como melhor rendimento obtido das três enzimas, seguida por papaína e pepsina, ou seja, praticamente na ordem inversa do que foi apontado pelos ensaios *in vitro*, como pode ser observado na Tabela 10. Os resultados dos rendimentos de hidrólise *in silico* corroboram em parte com as expectativas iniciais, quando acreditava-se que, devido a sua especificidade, a pepsina seria uma das enzimas que apresentaria baixo rendimento de hidrólise, o que foi superado com os resultados *in vitro* isso corrobora com o que foi apontando anteriormente em relação às expectativas quanto a digestão de cada enzima de acordo com as suas especificidades.

Segundo os programas utilizados para digestão, a especificidade das enzimas é apontada para pepsina, como a enzima mais específica, que cliva as ligações após os resíduos treonina e tirosina, Alcalase como protease específica para ligações envolvendo aminoácidos hidrofóbicos e/ou aromáticos como leucina, tirosina, fenilalanina no lado carboxila da ligação peptídica e com atividade semelhante à da quimotripsina e a papaína com especificidade e afinidade para arginina na posição P1, leucina na P2, glutamina na posição P1' e P2' e ácido aspartico na posição P4' (MINKIEWICZ et al., 2008). O que mostra algumas divergências com a literatura como, por exemplo, no estudo de ASBOTH et al., (1988) que apontou a preferência da papaína por um resíduo de aminoácido hidrofóbico, em particular a fenilalanina, na posição P2 do substrato. WANG et al. (2013) identificaram que uma das limitações do seu estudo com bioinformática na hidrólise *in silico* foi a incompatibilidade entre algumas informações do banco de dados dos programas com a literatura, como por exemplo a estrutura das proteínas e sequência aminoacídica, a especificidade das proteases envolvidas e suas diferenças de ação *in vitro* e *in silico* de acordo com seu grau de pureza e

tipo de obtenção comercial. De forma semelhante, MAJUMDER e WU (2010) encontraram dificuldade na hidrólise *in silico* do ovotransferrina pelas enzimas termolisina e pepsina, alegando ter divergências teóricas quanto à especificidade destas enzimas em clivar esse substrato.

Tabela 11. Análise de antioxidante *in silico*

<b>Enzima</b>	<b>Peptídeos total da hidrólise (n)</b>	<b>Peptídeos antioxidantes (n)</b>	<b>Peptídeos antioxidantes (%)</b>	<b>Valor médio do A% dos peptídeos antioxidantes</b>
<b>Alcalase</b>	4580	2	0,04	100
<b>Papaína</b>	448	36	8,04	11,99
<b>Pepsina</b>	469	53	11,30	12,38

A Tabela 11 apresenta os resultados da digestão *in silico* e a predição do potencial antioxidante dos peptídeos resultantes da digestão. Nela é possível observar que, diferentemente dos resultados *in vitro* (Figura 19), onde os hidrolisados da Alcalase e a papaína foram considerados os com melhor atividade antioxidante pelos métodos ABTS (8000mmol de Trolox/g de amostra) e ORAC (7000mmol de Trolox/g de amostra), respectivamente, *in silico* a pepsina foi a enzima que mais gerou peptídeos com capacidade antioxidante, porém, *in vitro*, os resultados desse hidrolisado foram inferiores (2000mmol de Trolox/ g de amostra, apêncie Figura 1 e 2). Todavia o A%, que representa a probabilidade desses peptídeos serem realmente antioxidantes foi maior para os peptídeos obtidos pela Alcalase do que o da pepsina.

A precisão e informações quanto às especificidades são cruciais para a predição e obtenção dos peptídeos antioxidante. A hidrólise incorreta quanto à especificidade/afinidade da enzima pode levar à produção de peptídeos que não sejam reconhecidos pelo banco de dados como sendo dos peptídeos bioativos. Como mencionado e discutido anteriormente sobre a hidólise *in silico*, os programas de bioinformática podem apresentar

incompatibilidades entre a literatura e as definições do programa quanto a característica da digestão de cada enzima, além da divergência entre a realidade *in silico* e *in vitro*. Neste mesmo sentido MAJUMDER e Wu (2010) relataram também a dificuldade da identificação dos peptídeos com potencial de inibição da ECA, pela base de dados, devido a incompatibilidade entre as especificidades enzimáticas teóricas da literatura e do programa utilizado, reforçando essas limitações WANG et al. (2017) apontaram para necessidade de um estudo futuro sobre a comparação entre análises *in silico* e *in vitro* para determinar a semelhança de estruturas peptídicas obtidas a partir da hidrólise enzimática e de outras características enzimáticas, para se ter resultados melhores e mais acurados.

Uma das limitações encontradas durante o estudo *in silico* e que pode explicar o resultado tão ínfimo da enzima Alcalase em relação à capacidade antioxidante, foi o fato de que os programas que fizeram o ranqueamento da possibilidade do peptídeo expressar a capacidade antioxidante excluí todos os resíduos formados por apenas um único aminoácido. E sabe-se que um hidrolisado proteico expressa seu potencial antioxidante pela presença e/ou soma dos peptídeos com essa capacidade (NILARAMATNE et al., 2015), ou seja, excluir resíduos que somados a outros poderiam expressar maior atividade pode ter prejudicado o desempenho desta enzima nesta avaliação. PIOVESANA et al. (2018), comentam sobre a importância de um banco de dados de bioinformática conter informações e levar em consideração a capacidade de resíduos formados por um único aminoácido e não só por uma sequência.

Cada vez mais os pesquisadores estão interessados em usar as novas ferramentas de bioinformática na análise de compostos de alimentos, incluindo peptídeos. Embora a quimioinformática apoiada por métodos quimiométricos seja um campo relativamente novo da ciência, pode ser aplicado com sucesso a análise *in silico* de peptídeos derivados de proteínas alimentares, mas a necessidade de alguns ajustes e a correlação com a abordagem clássica se faz necessária (UDENIGWE, 2014).

IWANIKA et al. (2015) discutiram que a análise *in silico* é eficaz em termos de custo e tempo, especialmente na perspectiva de testes adicionais de peptídeos bioativos *in vivo*. Contudo, deve-se notar que a confiabilidade na aplicação de dados adequados, como dados quimiométricos e método quimioinformático, depende de muitos fatores, por exemplo, a qualidade dos dados de entrada, o número de objetos e variáveis, a simplicidade de

interpretação de dados de saída de acordo ao método aplicado. Segundo ainda os mesmos autores, é difícil recomendar uma abordagem quimiométrica ou quimioinformática como a melhor e única metodologia para analisar peptídeos bioativos e que o número de bases de dados que fornecem informações químicas é alimentado constantemente , portanto, não é recomendado confiar em dados derivados de apenas um banco de dados.

## 6 CONCLUSÃO

Ao final da execução do presente estudo foi possível extrair algumas conclusões relevantes ao tema são elas listadas a seguir.

- Apesar de ter sido irrelevante para a ação das enzimas pepsina e papaína, o tratamento térmico impactou de modo positivo a ação da enzima Alcalase sobre a clara de ovo em pó. Indicando desta forma ser indispensável para aumento do rendimento de hidrólise desta enzima sobre a matriz protéica estudada;
- Embora a pepsina tenha apresentado o maior rendimento de hidrólise em 180 minutos de reação, os ensaios de capacidade antioxidante realizados *in vitro* (ABTS e ORAC) apontaram que o seu hidrolisado apresentou atividade inferior aos das demais enzimas testadas. Possibilitando concluir que nem sempre o maior grau de hidrólise resulta em hidrolisados com maior atividade antioxidante;
- Os métodos de secagem por liofilização e *spray dryer* foram capazes de aumentar a capacidade antioxidantes dos hidrolisados proteicos de clara ovos obtidos por ação das enzimas Alcalase e papaína. Sendo o *spray dryer* o melhor método para o aumento da atividade e com relação a menor tempo de secagem, menor custo operacional e maior rendimento pós-secagem;
- Apesar de muitos autores considerarem as ferramentas de bioinformática como excelentes para predição da bioatividade e simulação da digestão *in vitro*, nossos resultados mostraram limitações desse método e algumas discordâncias entre a literatura e os parâmetros utilizado pelos programas. Demonstrando dessa forma que essas ferramentas precisam ser aprimoradas e os bancos de dados atualizados;
- Os hidrolisados de clara de ovo em pó foram capazes de retardar a formação de substâncias reativas formadas pela degradação dos lipídeos de homogenatos de peixe (até 5 dias) e frango (até 14 dias) durante o armazenamento. Demonstrando dessa forma sua capacidade em ser indicado para conservação desses alimentos em comparação com antioxidante sintético padrão.

## 7 REFERÊNCIAS

ABEYRATHNE, E. D. N. S. et al. Enzymatic hydrolysis of ovalbumin and the functional properties of the hydrolysates. **Poultry science**, v. 93, n. 10, p. 2678-2686, 2014.

ABEYRATHNE, E. D. N. S. et al. Enzymatic hydrolysis of ovomucin and the functional and structural characteristics of peptides in the hydrolysates. **Food chemistry**, v. 192, p. 107-113, 2016.

ABEYRATHNE, E. D. N. S. et al. Enzymatic hydrolysis of ovomucoid and the functional properties of its hydrolysates. **Poultry science**, v. 94, n. 9, p. 2280-2287, 2015.

ABPA, Associação Brasileira de Proteína Animal. (2018). Relatório Anual 2017. Brasil, São Paulo. Disponível em: <http://abpa-br.com.br/storage/files/relatorio-anual-2018.pdf>

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). 2016. Anvisa atualiza lista de alegações de propriedades funcionais e de saúde. ANVISA, Brasília, Brasil. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset\\_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/anvisa-atualiza-lista-de-alegacoes-de-propriedades-funcionais-e-de-saude/219201?inheritRedirect=false](http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/anvisa-atualiza-lista-de-alegacoes-de-propriedades-funcionais-e-de-saude/219201?inheritRedirect=false)

AGRAWAL, Himani; JOSHI, Robin; GUPTA, Mahesh. Isolation, purification and characterization of antioxidative peptide of pearl millet (*Pennisetum glaucum*) protein hydrolysate. **Food chemistry**, v. 204, p. 365-372, 2016.

ALAM, Md Nur; BRISTI, Nusrat Jahan; RAFIQUZZAMAN, Md. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, n. 2, p. 143-152, 2013.

ALVES, Clayton Queiroz et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. 2010.

AMARAL, Gisele Ferreira et al. Avicultura de postura: estrutura da cadeia produtiva, panorama do setor no Brasil e no mundo e o apoio do BNDES. 2015.

ANTON, Marc. Composition and structure of hen egg yolk. In: **Bioactive egg compounds**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2007. p. 1-6.

ASBÓTH, B.; et al. Cysteine proteases: the S2 P2 hydrogen bond is more important for catalysis than is the analogous S1P1 bond. **FEB**, v. 233, n 2, p. 339-341, 1988.

BAI, Jing-Jing et al. Changes in Quality Characteristics of Pork Patties Containing Antioxidative Fish Skin Peptide or Fish Skin Peptide-loaded Nanoliposomes during Refrigerated Storage. **Korean journal for food science of animal resources**, v. 37, n. 5, p. 752, 2017.

BANKUS, J. M., e BOND, J. S. Some commercially available proteases. In: **Proteolytic Enzymes (Second Edition)**,. Beynon, R., and Bond, J. S. (Eds.), Oxford University Press, Oxford,UK. pp. 295-316, 2001.

BARLOW, S.M. Toxicological Aspects of Antioxidants Used as Food Additives. In **Food antioxidants**.By HUDSON, Bertram J. .Springer Science & Business Media.253-308, 2012.

BARON, Florence et al. Egg white versus Salmonella Enteritidis! A harsh medium meets a resilient pathogen. **Food microbiology**, v. 53, p. 82-93, 2016.

BAYLISS, William Maddock; STARLING, Ernest Henry.The mechanism of pancreatic secretion. **The Journal of physiology**, v. 28, n. 5, p. 325-353, 1902.

BELADI-MOUSAVI, Seyed Seifollah et al. Relationship between free radicals and risk of kidney diseases; the role of antioxidants and their reaction mechanisms. **Annals of Research in Antioxidants**, v. 1, n. 1, 2016.

BERMOND, P..Biological Effects of Food Antioxidants.In Food antioxidants.By HUDSON, Bertram J. .Springer Science & Business Media.193-250, 2012.

BERTECHINI, A. G. Mitos e verdades sobre o ovo e consumo. In: **Conferência Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas**. 2003. p. 19.

BHANDARI, Bhesh R.; PATEL, Kamlesh C.; CHEN, Xiao Dong. Spray drying of food materials-process and product characteristics. **Drying technologies in food processing**, v. 4, p. 113-157, 2008.

BIOPEP .disponível em <http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/pl/biopep>. acesso em Julho de 2018.

BORGES, Leonardo Luiz et al. Uma abordagem sobre métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer–Goiânia-GO**, v. 7, n. 12, 2011.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, 72(1-2), 248-254, 1976.

BRAND-WILLIAMS, Wendy; CUVELIER, Marie-Elisabeth; BERSET, C. L. W. T. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRENDA (BRaunschweig ENzyme DAtabase). Disponível em: <http://www.brenda-enzymes.org>. Acesso em Agosto 2017. 2018.

BURLEY, R.W., VADEHRA, D.V.. The albumen: biosynthesis. In: **The Avian Egg Chemistry and Biology**. John Wiley and Sons, New York, pp. 129-145, 1989

CALDERÓN, AM; RUIZ-SALAZAR, R. A.; JARA-MARINI, M. E. Enzymatic hydrolysis and synthesis of soy protein to improve its amino acid composition and functional properties. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 2, p. 246-253, 2000.

CAMPOS, A. M.; LISSI, E. A. Kinetics of the reaction between 2, 2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) derived radical cations and phenols. **International Journal of Chemical Kinetics**, v. 29, n. 3, p. 219-224, 1997.

CAO, Guohua; ALESSIO, Helaine M.; CUTLER, Richard G. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. **Free radical biology and medicine**, v. 14, n. 3, p. 303-311, 1993.

CARRILLO, W. et al. Identification of antioxidant peptides of hen egg-white lysozyme and evaluation of inhibition of lipid peroxidation and cytotoxicity in the Zebrafish model. **European Food Research and Technology**, v. 242, n. 10, p. 1777-1785, 2016.

CASTRO, Ruann Janser Soares; SATO, Helia Harumi. Biologically active peptides: Processes for their generation, purification and identification and applications as natural additives in the food and pharmaceutical industries. **Food Research International**, v. 74, p. 185-198, 2015.

CECCHI, Heloísa Máscia. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. Editora da UNICAMP, 2003.

CHAMBERS, James R. et al. Chicken Eggs. In: **Egg Innovations and Strategies for Improvements**. p. 1-9, 2017.

CHANG, Chang et al. Egg proteins: Fractionation, bioactive peptides and allergenicity. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, n. 15, p. 5547-5558, 2018.

CHEN, Chen et al. Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant and ACE inhibitory activities of egg white protein hydrolysate. **Food Science and Biotechnology**, v. 21, n. 1, p. 27-34, 2012a

CHEN, Chen et al. Purification and identification of antioxidant peptides from egg white protein hydrolysate. **Amino acids**, v. 43, n. 1, p. 457-466, 2011a.

CHEN, Chen et al. Purification and identification of antioxidant peptides from egg white protein hydrolysate. **Amino acids**, v. 43, n. 1, p. 457-466, 2012 .

CHEN, Chen; CHI, Yu-Jie; XU, Wei. Comparisons on the functional properties and antioxidant activity of spray-dried and freeze-dried egg white protein hydrolysate. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 6, p. 2342-2352, 2011

CHEN, Hua-Ming et al. Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 44, n. 9, p. 2619-2623, 1996.

CHEN, Hua-Ming et al. Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 46, n. 1, p. 49-53, 1998.

CHEN, Yi-Chao et al. Antioxidative activities of hydrolysates from duck egg white using enzymatic hydrolysis. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 22, n. 11, p. 1587-1593, 2009.

CHORILLI, Marlus; LEONARDI, Gislaine Ricci; SALGADO, Hérica Regina Nunes. Radicais livres e antioxidantes: conceitos fundamentais para aplicação em formulações farmacêuticas e cosméticas. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 88, n. 3, p. 113-118, 2007.

COTINGUIBA, George Gomes et al. Método de avaliação da defesa antioxidante: uma revisão de literatura. **Journal of Health Sciences**, v. 15, n. 3, 2015.

CUNHA, Fernanda Lima et al. Processamento, pasteurização, desidratação e outros processos similares de conservação de ovos de consumo. **PUBVET**, v. 6, p. Art.1450-1454, 2012.

DÁVALOS, A. et al. Antioxidant activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. **Journal of food protection**, v. 67, n. 9, p. 1939-1944, 2004.

DENG, Yuxi; GRUPPEN, Harry; WIERENGA, Peter A. Comparison of Protein Hydrolysis Catalyzed by Bovine, Porcine, and Human Trypsins. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 66, n. 16, p. 4219-4232, 2018.

DUAN, Xiang et al. Purification and characterization of a natural antioxidant peptide from fertilized eggs. **Food research international**, v. 56, p. 18-24, 2014.

ELIAS, Ryan J.; KELLERBY, Sarah S.; DECKER, Eric A. Antioxidant activity of proteins and peptides. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 48, n. 5, p. 430-441, 2008.

ELSON, H. A. et al. Housing and husbandry of laying hens: Past, present and future. **Lohmann Information**, v. 46, n. 2, p. 16-24, 2011.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa). Embrapa suínos e aves, Central de inteligência de aves e suínos. Disponível em <https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/cias/estatisticas/ovos>, Acesso em Janeiro de 2018.

EVANS, Catherine R; MILLER, Nicholas; PAGANGA, George. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in plant science**, v. 2, n. 4, p. 152-159, 1997.

FALEIRO, Fábio Gelape et al. Caracterização de germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro assistidos por marcadores moleculares: resultados de pesquisa 2005-2008. **Embrapa Cerrados-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)**, 2008.

FARIAS, Ticiane de Carvalho. Obtenção enzimática de hidrolisado protéico de soja com atividade antioxidante para uso em alimentos (**Dissertação de Mestrado**). Orientadora: Maria Gabriela Bello Koblitz. Programa de pós Graduação em Alimentos e Nutrição PPGAN/UNIRIO. 2017.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da associação médica brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics Division (FAOSTAT), Total world production (1000 tonnes): hen eggs, in shell, 2004-2018 by country. Disponível em : <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QL>. Acesso em Janeiro de 2018

FOX, P. F.; MORRISSEY, P. A.; MULVIHILL, D. M. Chemical and enzymatic modification of food proteins. **Developments in food proteins**, 1982.

GEVEKE, David J.; TORRES, Daniel. Liquid egg white pasteurization using a centrifugal UV irradiator. **International journal of food microbiology**, v. 162, n. 1, p. 43-47, 2013.

GIANSANTI, Francesco et al. The nutraceutical properties of ovotransferrin and its potential utilization as a functional food. **Nutrients**, v. 7, n. 11, p. 9105-9115, 2015.

GRASZKIEWICZ, Aleksandra; ZELAZKO, Monika; TRZISZKA, Tadeusz. Application of pancreatic enzymes in hydrolysis of egg-white proteins. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 60, n. 1, 2010.

GUARINO, Chiara et al. Development of an RP-HPLC method for the simultaneous determination of benzoic acid, sorbic acid, natamycin and lysozyme in hard and pasta filata cheeses. **Food chemistry**, v. 127, n. 3, p. 1294-1299, 2011.

- GUO, Hang; KOUZUMA, Yoshiaki; YONEKURA, Masami. Structures and properties of antioxidative peptides derived from royal jelly protein. **Food Chemistry**, v. 113, n. 1, p. 238-245, 2009.
- HALLIWELL, Barry. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. **Nutrition reviews**, v. 70, n. 5, p. 257-265, 2012.
- HAMMERSHØJ, Marianne; NEBEL, Caroline; CARSTENS, Jan H. Enzymatic hydrolysis of ovomucin and effect on foaming properties. **Food Research International**, v. 41, n. 5, p. 522-531, 2008.
- HARTMANN, Rainer; MEISEL, Hans. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. **Current opinion in biotechnology**, v. 18, n. 2, p. 163-169, 2007.
- HARVEY, Richard A.; FERRIER, Denise R. **Bioquímica ilustrada**. Artmed Editora, 2015.
- HE, Shan; FRANCO, Chris; ZHANG, Wei. Functions, applications and production of protein hydrolysates from fish processing co-products (FPCP). **Food Research International**, v. 50, n. 1, p. 289-297, 2013.
- HIIDENHOVI, J.. Ovomucin. In: Huopalahti, R., Lopez-Fandino, R., Anton, M., Schade, R. (Eds.), **Bioactive Egg Compounds**. Springer, Heidelberg, pp. 61e68, 2007.
- HIIDENHOVI, Jaakko et al. Comparison of different egg albumen fractions as sources of ovomucin. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 50, n. 10, p. 2840-2845, 2002.
- HIIDENHOVI, Jaakko et al. Hydrolysis of ovomucin by different enzymes. In: **Proc Eleventh Europ symp qual eggs egg prod**. 2005. p. 23-26.
- HOLLMAN, P\_C H.; KATAN, Martijn B. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. **Food and chemical toxicology**, v. 37, n. 9-10, p. 937-942, 1999.
- HORIMOTO, Yasumi; LIM, Loong-Tak. Effects of different proteases on iron absorption property of egg white hydrolysates. **Food Research International**, v. 95, p. 108-116, 2017.

HOYLE, NANA T.; MERRLTT, JOHN H. Quality of fish protein hydrolysates from herring (*Clupea harengus*). **Journal of food Science**, v. 59, n. 1, p. 76-79, 1994.

HUDSON, Bertram J. **Food antioxidants**. Springer Science & Business Media, 2012.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). (2018). Pesquisa da Pecuária Municipal 2017. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Rio de Janeiro, Brasil. Disponível: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html?=&t=o-que-e>. Acesso em Janeiro de 2019.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). (2018). Produção de Ovos de Galinha. 2017. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Rio de Janeiro, Brasil. Disponível: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/9216-pesquisa-trimestral-da-producao-de-ovos-de-galinha.html?=&t=o-que-e>. Acesso em Janeiro de 2019.

ISHWARYA, S. Padma; ANANDHARAMAKRISHNAN, C.; STAPLEY, Andrew GF. Spray-freeze-drying: a novel process for the drying of foods and bioproducts. **Trends in Food Science & Technology**, v. 41, n. 2, p. 161-181, 2015.

ITOH, TAKATOSHI et al. Studies on the characterization of ovomucin and chalaza of the hen's egg. **Journal of Food Science**, v. 52, n. 6, p. 1518-1521, 1987.

IWANIAK, Anna et al. Chemometrics and cheminformatics in the analysis of biologically active peptides from food sources. **Journal of Functional Foods**, v. 16, p. 334-351, 2015.

JAHANDIDEH, Forough et al. Antioxidant peptides identified from ovotransferrin by the ORAC method did not show anti-inflammatory and antioxidant activities in endothelial cells. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 64, n. 1, p. 113-119, 2015.

JAKUBCZYK, Anna et al. Identification of potential inhibitory peptides of enzymes involved in the metabolic syndrome obtained by simulated gastrointestinal digestion of fermented bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds. **Food Research International**, v. 100, p. 489-496, 2017.

JEON, You-Jin; BYUN, Hee-Guk; KIM, Se-Kwon. Improvement of functional properties of cod frame protein hydrolysates using ultrafiltration membranes. **Process biochemistry**, v. 35, n. 5, p. 471-478, 1999.

JIANG, Bin et al. Separation of Antioxidant Peptides from Pepsin Hydrolysate of Whey Protein Isolate by ATPS of EOPO Co-polymer (UCON)/Phosphate. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 13320, 2017.

JIANG, Jiang; XIONG, Youling L. Natural antioxidants as food and feed additives to promote health benefits and quality of meat products: A review. **Meat science**, v. 120, p. 107-117, 2016.

JOVANOVIĆ, Jelena R. et al. Improvement of antioxidant properties of egg white protein enzymatic hydrolysates by membrane ultrafiltration. **Hemijska industrija**, n. 00, p. 47-47, 2016.

JOVANOVIĆ, Jelena R. et al. Ultrasound Pretreatment as an Useful Tool to Enhance Egg White Protein Hydrolysis: Kinetics, Reaction Model, and Thermodynamics. **Journal of food science**, v. 81, n. 11, p. C2664-C2675, 2016.

KATO, Ikunoshin et al. Chicken ovomucoid: determination of its amino acid sequence, determination of the trypsin reactive site, and preparation of all three of its domains. **Biochemistry**, v. 26, n. 1, p. 193-201, 1987.

KEHINDE, Bababode Adesegun; SHARMA, Poorva. Recently isolated antidiabetic hydrolysates and peptides from multiple food sources: a review. **Critical reviews in food science and nutrition**, p. 1-19, 2018.

KERKAERT, Barbara; DE MEULENAER, Bruno. Detection of hen's egg white lysozyme in food: Comparison between a sensitive HPLC and a commercial ELISA method. In: **234th ACS National Meeting and Exposition**. American Chemical Society (ACS), 2007.

KETNAWA, Sunantha et al. Physical, chemical, and microbiological properties of fish tofu containing shrimp hydrolysate. **Fisheries science**, v. 82, n. 2, p. 379-389, 2016.

KITTS, David D. Bioactive substances in food: identification and potential uses. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 72, n. 4, p. 423-434, 1994.

KLAJN, Vera Maria et al. Compostos antioxidantes em aveia. **Revista brasileira de agrociencia**, v. 18, n. 4, p. 292-303, 2012.

KOBLITZ, M. G. B. **Matérias-primas alimentícias: Composição e controle de qualidade**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 252-265, 2014.

KORHONEN, Hannu; PIHLANTO, Anne. Bioactive peptides: production and functionality. **International dairy journal**, v. 16, n. 9, p. 945-960, 2006.

KOVACS-NOLAN, Jennifer et al. Immunochemical and structural analysis of pepsin-digested egg white ovomucoid. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 48, n. 12, p. 6261-6266, 2000.

KOVACS-NOLAN, Jennifer; PHILLIPS, Marshall; MINE, Yoshinori. Advances in the value of eggs and egg components for human health. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 22, p. 8421-8431, 2005.

KRIS-ETHERTON, Penny M. et al. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. **The American journal of medicine**, v. 113, n. 9, p. 71-88, 2002.

KRISTINSSON, Hordur G.; RASCO, Barbara A. Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 40, n. 1, p. 43-81, 2000.

KUSKOSKI, E. Marta et al. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Food Science and Technology**, v. 25, n. 4, p. 726-732, 2005.

LAEMMLI, Ulrich K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **nature**, v. 227, n. 5259, p. 680, 1970.

LECHEVALIER, V., Croguennec, T., Nau, F., Guerin-Dubiard, C. Ovalbumin and gene-related proteins. In: **Bioactive Egg Compounds**. By Huopalahti, R., Lopez-Fandino, R., Anton, M., Schade, R. (Eds.), Springer, Heidelberg, pp. 51-60, 2007.

LECHEVALIER, V.; Croguennec, T.; Anton, M. e Nau, F. Egg products: functional ingredients for complex matrices. **INRA Productions Animales**, v. 23, n. 2, p. 215-224, 2010.

LEE, Jae Hoon et al. Antioxidant and anticancer effects of functional peptides from ovotransferrin hydrolysates. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 14, p. 4857-4864, 2017.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Amino acids and peptides. **Lehninger: Principles of Biochemistry**, v. 2, p. 111-133, 1993.

LEI, Bo et al. Effect of sonication on thermolysin hydrolysis of ovotransferrin. **Food chemistry**, v. 124, n. 3, p. 808-815, 2011.

LI, Xue et al. Stability of papain-treated grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) protein hydrolysate during food processing and its ability to inhibit lipid oxidation in frozen fish mince. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 1, p. 542-548, 2015.

LIAPIS, A. I.; BRUTTINI, R. A mathematical model for the spray freeze drying process: The drying of frozen particles in trays and in vials on trays. **International Journal of Heat and Mass Transfer**, v. 52, n. 1-2, p. 100-111, 2009.

LI-CHAN, E. Biochemical basis for the properties of egg white. **CRC Crit. Rev. Poultry Biol.**, v. 2, p. 21-58, 1989.

LI-CHAN, E.C.Y., KIM, H.-O.. Structure and chemical composition of eggs. In: **Egg Bioscience and Biotechnology**. (Ed.), By Mine, Y. Wiley-Interscience, Hoboken, NJ, pp. 1-8, 2008.

LI-CHAN, Eunice CY et al. The chemistry of eggs and egg products. **Egg science and technology**, v. 4, p. 105-75, 1995.

LI-CHAN, Eunice CY. Bioactive peptides and protein hydrolysates: research trends and challenges for application as nutraceuticals and functional food ingredients. **Current Opinion in Food Science**, v. 1, p. 28-37, 2015.

LI-CHAN, Eunice CY; KIM, Hyun-Ock. Structure and chemical composition of eggs. In: **Egg bioscience and biotechnology**. John Wiley and Sons Inc., New Jersey, 2008. p. 1-96.

LIOCHEV, Stefan I. Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 60, p. 1-4, 2013.

LIU JB, Yu ZP, Zhao WZ, Lin SY, Wang EL, Zhang Y, et al., Isolation and identification of angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from egg white protein hydrolysates. **Food Chem** 122:1159–1163 , 2010.

LIU, Jingbo et al. Purification and identification of novel antioxidant peptides from egg white protein and their antioxidant activities. **Food chemistry**, v. 175, p. 258-266, 2015.

LIU, Qing; YAO, Huiyuan. Antioxidant activities of barley seeds extracts. **Food chemistry**, v. 102, n. 3, p. 732-737, 2007.

LIU, Ya-Fei et al. Bioactive peptides derived from egg proteins: A review. **Critical reviews in food science and nutrition**, p. 1-23, 2017.

LIU, Ya-Fei et al. In vitro peptic digestion of ovomucin-depleted egg white affected by pH, temperature and pulsed electric fields. **Food chemistry**, v. 231, p. 165-174, 2017.

LIU, Yongzhong; ZHAO, Yanfei; FENG, Xiao. Exergy analysis for a freeze-drying process. **Applied Thermal Engineering**, v. 28, n. 7, p. 675-690, 2008.

LOBO, Vijaya et al. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacognosy reviews**, v. 4, n. 8, p. 118, 2010.

LOPEZ-QUIROGA, E., Antelo, L. T., & Alonso, A. A. Time scale modeling and optimal control of freeze drying. *Journal of Food Engineering*, 111, 655- 666, 2012.

LOWRY, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265-27, 1951.

MA, Shuang et al. Quality characteristic of spray-drying egg white powders. **Molecular biology reports**, v. 40, n. 10, p. 5677-5683, 2013.

MAGALHÃES, Luís M. et al. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. **Analytica chimica acta**, v. 613, n. 1, p. 1-19, 2008.

MAJUMDER, Kaustav; WU, Jianping. A new approach for identification of novel antihypertensive peptides from egg proteins by QSAR and bioinformatics. **Food Research International**, v. 43, n. 5, p. 1371-1378, 2010.

MÄKINEN, Sari et al. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory and antihypertensive properties of potato and rapeseed protein-derived peptides. **Journal of functional foods**, v. 25, p. 160-173, 2016.

MARRONI, N. P.; MARRONI, C. A. Estresse Oxidativo e antioxidante. **ULBRA, Canoas**, 2002.

MARTOS, Gustavo et al. Mechanisms underlying differential food allergy response to heated egg. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 127, n. 4, p. 990-997. e2, 2011.

MASON, Anne B. et al. Association of the two lobes of ovotransferrin is a prerequisite for receptor recognition. Studies with recombinant ovotransferrins. **Biochemical Journal**, v. 319, n. 2, p. 361-368, 1996.

MAZZUCO, Helenice. Ovo: alimento funcional, perfeito à saúde. *Avic. Ind*, n. 2, p. 12-16, 2008.

MEISEL, H.; FITZGERALD, R. J. Biofunctional peptides from milk proteins: mineral binding and cytomodulatory effects. **Current pharmaceutical design**, v. 9, n. 16, p. 1289-1296, 2003.

MELLANDER, O. L. O. F. et al. The physiological importance of the casein phosphopeptide calcium salts. II. Peroral calcium dosage of infants. Some aspects of the pathogenesis of rickets. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**, v. 55, p. 247-257, 1950.

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

MINE, Y.; RUPA, P. Immunological and biochemical properties of egg allergens. **World's Poultry Science Journal**, v. 60, n. 3, p. 321-330, 2004.

MINE, Yoshinori. Recent advances in egg protein functionality in the food system. **World's poultry science journal**, v. 58, n. 1, p. 31-39, 2002.

MINE, Yoshinori; KOVACS-NOLAN, Jennifer. Biologically active hen egg components in human health and disease. **The Journal of Poultry Science**, v. 41, n. 1, p. 1-29, 2004.

MINE, Yoshinori; LI-CHAN, Eunice; JIANG, Bo (Ed.). **Bioactive proteins and peptides as functional foods and nutraceuticals**. John Wiley & Sons, 2011.

MINE, Yoshinori; MA, Fupeng; LAURIAU, Sophie. Antimicrobial peptides released by enzymatic hydrolysis of hen egg white lysozyme. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 5, p. 1088-1094, 2004.

MINE, Yoshinori; ZHANG, Hua. Egg components in food systems. In: **Biochemistry of Foods (Third Edition)**. p. 215-241, 2013.

MINE, Yoshinori; ZHANG, Jie Wei. The allergenicity of ovomucoid and the effect of its elimination from hen's egg white. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 81, n. 15, p. 1540-1546, 2001.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). AGROSTAT- Estatística do Comércio Exterior do Agronegócio Brasileiro. Disponível em: <http://indicadores.agricultura.gov.br/agrostat/index.htm> .Acesso em Janeiro 2018.

MINKIEWICZ, Piotr et al. BIOPEP database and other programs for processing bioactive peptide sequences. **Journal of AOAC International**, v. 91, n. 4, p. 965-980, 2008.

MITTLER, Ron. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in plant science**, v. 7, n. 9, p. 405-410, 2002.

mMass - Open Source Mass Spectrometry Tool. Disponível em <http://www.mmass.org/>. Acesso em Julho de 2018.

MOJICA, Luis; LUNA-VITAL, Diego A.; DE MEJIA, Elvira Gonzalez. Black bean peptides inhibit glucose uptake in Caco-2 adenocarcinoma cells by blocking the expression and translocation pathway of glucose transporters. **Toxicology reports**, v. 5, p. 552-560, 2018.

MÖLLER, Niels Peter et al. Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. **European journal of nutrition**, v. 47, n. 4, p. 171-182, 2008.

MOURE, Andres; DOMÍNGUEZ, Herminia; PARAJÓ, Juan Carlos. Antioxidant properties of ultrafiltration-recovered soy protein fractions from industrial effluents and their hydrolysates. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 2, p. 447-456, 2006.

MUMENTHALER, M.; LEUENBERGER, H. Atmospheric spray-freeze drying: a suitable alternative in freeze-drying technology. **International journal of pharmaceuticals**, v. 72, n. 2, p. 97-110, 1991.

NAGAOKA, Satoshi et al. Egg ovomucin attenuates hypercholesterolemia in rats and inhibits cholesterol absorption in Caco-2 cells. **Lipids**, v. 37, n. 3, p. 267-272, 2002.

NIKI, Etsuo. Lipid peroxidation: physiological levels and dual biological effects. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47, n. 5, p. 469-484, 2009.

NIMALARATNE, Chamila; BANDARA, Nandika; WU, Jianping. Purification and characterization of antioxidant peptides from enzymatically hydrolyzed chicken egg white. **Food chemistry**, v. 188, p. 467-472, 2015.

NOH, Dong Ouk; SUH, Hyung Joo. Preparation of egg white liquid hydrolysate (ELH) and its radical-scavenging activity. **Preventive nutrition and food science**, v. 20, n. 3, p. 183, 2015.

NONGONIERMA, Alice B.; FITZGERALD, Richard J. Learnings from quantitative structure–activity relationship (QSAR) studies with respect to food protein-derived bioactive peptides: a review. **RSC Advances**, v. 6, n. 79, p. 75400-75413, 2016.

NOVELLO, Daiana et al. Ovo: Conceitos, análises e controvérsias na saúde humana. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 56, n. 4, p. 315-320, 2006.

NYS, Y.; GUYOT, N. Egg formation and chemistry. In: **Improving the Safety and Quality of Eggs and Egg Products: Egg Chemistry, Production and Consumption**. p. 83-132, 2011.

OMANA D.A.; WU J.P., A new method of separating ovomucin from egg white. **J Agric Food Chem** 57:3596–3603 , 2009.

OMANA, Dileep A.; WANG, Jiapei; WU, Jianping. Ovomucin—a glycoprotein with promising potential. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, n. 9, p. 455-463, 2010.

ORDÓÑEZ-PEREDA, J. A. et al. Tecnologia de alimentos-Alimentos de Origem Animal.v. 2. **Artmed, Porto Alegre**, 2005.

ORNELLAS, L. H. **Técnica Dietética, seleção e preparo de alimentos**. 330p São Paulo: Atheneu, 2001.

OSEGUERA-TOLEDO, M. E., G. E. de Mejia, M. Sivaguru, and A. S. Llano. Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein-derived peptides increased insulin secretion, inhibited lipid accumulation, increased glucose uptake and reduced the phosphatase and tensin homologue activation in vitro. *Journal of Functional Foods* 27:160–77, 2016.

OU, Boxin; HAMPSCH-WOODILL, Maureen; PRIOR, Ronald L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 49, n. 10, p. 4619-4626, 2001.

PACHECO, MTB; SGARBIERI, V. C. Revisão: alimentos funcionais fisiológicos. **brazilian Journal of food technology**, v. 2, n. 2, p. 7-19, 1999.

PALIKA, Ravindranadh et al. Characterization of iron-binding phosphopeptide released by gastrointestinal digestion of egg white. **Food Research International**, v. 67, p. 308-314, 2015.

Peptide Ranker .disponível em <http://bioware.ucd.ie/~compass/biowareweb/>. Acesso em Julho 2018.

PÉREZ-JIMÉNEZ, Jara et al. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. **Food Research International**, v. 41, n. 3, p. 274-285, 2008.

PERIČIN, D., Radulović-Popović, L., Vaštag, Ž., Mađarev-Popović, S., & Trivić, S. Enzymatic hydrolysis of protein isolate from hull-less pumpkin oil cake: application of response surface methodology. **Food Chemistry**, 115(2), 753-757, 2009.

PERUZZO, Francisco Miragaia (Tito); CANTO, Eduardo Leite; **Química na Abordagem do Cotidiano**, Ed. Moderna, vol.1, São Paulo/SP- 1998

PHILIPPI, S. T. **Nutrição e Dietética**. 2ª edição. 402p. São Paulo: Manole, 2006.

PIMENTEL, C. V. M. B.; FRANCKI, V. M.; GOLLÜCKE, A. P. B. **Alimentos funcionais**. São Paulo: Varela, 2005.

PIOVESANA, Susy et al. Recent trends and analytical challenges in plant bioactive peptide separation, identification and validation. **Analytical and bioanalytical chemistry**, p. 1-20, 2018.

PLATE, N. A. et al. Mucoadhesive polymers with immobilized proteinase inhibitors for oral administration of protein drugs. **Biomaterials**, v. 23, n. 7, p. 1673-1677, 2002.

POWIRE, W. D. Characteristics of edible fluids of animal origin: eggs. **Food Chemistry**, p. 829-855, 1985.

PRIOR, Ronald L.; CAO, Guohua. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. **Free radical biology and medicine**, v. 27, n. 11-12, p. 1173-1181, 1999.

PRIOR, Ronald L.; WU, Xianli; SCHAICH, Karen. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 10, p. 4290-4302, 2005.

Protease Specificity Prediction Server (PROSPER) 2012. Disponível em <https://prospcr.erc.monash.edu.au/methodology.html>. acesso em Janeiro de 2019.

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

RAJAGOPALAN, T. G.; MOORE, Stanford; STEIN, William H. Pepsin from pepsinogen preparation and properties. *Journal of Biological Chemistry*, v. 241, n. 21, p. 4940-4950, 1966.

RAJAPAKSE, Niranjan et al. Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties. *Food Research International*, v. 38, n. 2, p. 175-182, 2005.

RAO, Shengqi et al. ACE inhibitory peptides and antioxidant peptides derived from in vitro digestion hydrolysate of hen egg white lysozyme. *Food chemistry*, v. 135, n. 3, p. 1245-1252, 2012.

RATNAM, D. Venkat et al. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of controlled release*, v. 113, n. 3, p. 189-207, 2006.

RATTI, C. Freeze and vacuum drying of foods. *In Drying technologies in food processing*. By X. D. Chen, & A. S. Mujumdar (Eds.), (pp. 225e251). Singapore: Blackwell Publishing, 2008.

RAUD-MATTEDI C. Os alimentos funcionais: A nova fronteira da indústria alimentar. *Revista Sociologia Política*, v.16, n.31, p. 85-100, 2008

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICEEVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, New York, v. 26, p. 1231– 1237, 1999

RÉHAULT S. Antiproteases. In: *Bioactive Egg Compounds* . By Huopalahti R., López-Fandiño R., Anton M., Schade R. (eds). Springer, Berlin, Heidelberg, 2007.

REN, Y., Wu, H., Li, X., Lai, F., & Xiao, X. Purification and characterization of high antioxidant peptides from duck egg white protein hydrolysates. **Biochemical and biophysical research communications**, 452(4), 888-894, 2014.

RIBEIRO, Eliana Paula; SERAVALLI, Elisena Aparecida Guastafarro. **Química de alimentos**. Instituto Mauá de Tecnologia, 2007.

RIZZELLO, C. G., Tagliazucchi, D., Badini, E., Rutella, G. S.; Saa, D. L. T.; Gianotti, A. Bioactive peptides from vegetable food matrices: Research trends and novel biotechnologies for synthesis and recovery. **Journal of Functional Foods**, 27, 549–569, 2016.

ROBERFROID, M. Functional food concept and its application to prebiotics. **Digestive and Liver Disease**, v. 34, p. 105–110, 2002.

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 DPPH. **Comunicado Técnico online**, Fortaleza, 2007.

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G.; PÉREZJIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.G., Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP) **Comunicado técnico on line** EMBRAPA Agroindústria Tropical, nº 125, 2006.

RYAN, L.; THONDRE, P.S.; HENRY, C.J.K. Oat-based breakfast cereals are a rich source of polyphenols and high in antioxidant potential. **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 24, p. 929–934, 2011.

SÁNCHEZ-RIVERA, L.; MARTÍNEZ-MAQUEDA, D.; CRUZ-HUERTA, E.; MIRALLES, B.; RECIO, I. Peptidomics for discovery, bioavailability and monitoring of dairy bioactive peptides. **Food Research International**, 2014.

SANTO, Edson Francisco do Espírito et al .Comparison between freeze and spray drying to obtain powder *Rubrivivax gelatinosus* biomass. **Food Sci. Technol** (Campinas), Campinas , v. 33, n. 1, p. 47-51, 2013 .

SANTOS, ET AL, Influência do processamento e da torrefação sobre a atividade do café (Coffea arabica). **Química Nova**. 30, 604-610, 2007

SANTOS, H. S.; CRUZ, W. M. S. A terapia nutricional com vitaminas antioxidantes e o tratamento quimioterápico e oncológico. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 47, n.3, p. 303-08, 2001.

SANTOS, S. N., Castanha, R. F., Haber, L. L., Marques, M. O. M., & SCRAMIN, S. Determinação quantitativa da atividade antioxidante de extratos brutos de microrganismos pelo método de captura de radical livre DPPH. Embrapa Meio Ambiente. **Comunicado Técnico**, 2011.

Sardarodiyani, M., & Mohamadi Sani, A.. Natural antioxidants: sources, extraction and application in food systems. **Nutrition & Food Science**, 46(3), 363–373, 2016.

SARMADI, B. H., & ISMAIL, A. Antioxidative peptides from food proteins: A review. **Peptides**, 31(10), 1949–1956, 2010.

SAURA-CALIXTO, F. D. et al. Determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução de ferro (FRAP): metodologia científica. Fortaleza: EMBRAPA, 2006.

SAXENA I, TAYYAB S .Protein proteinase inhibitors from avian egg whites.**Cell Mol Life Sci** 53:13–23,1997.

SCHECHTER, Israel; BERGER, Arieh.On the active site of proteases. III. Mapping the active site of papain; specific peptide inhibitors of papain. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 32, n. 5, p. 898-902, 1968.

SCHULER, P. 2012. Natural Antioxidants Exploited Commercially. In **Food antioxidants**.By HUDSON, Bertram J. .Springer Science & Business Media. 99-170, 2012.

SGARBIERI, Valdemiro C. Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações e modificações. In: **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações e modificações**. 1996.

SHAHIDI, F. Antioxidants in food and food antioxidants. **Food/nahrung**, v. 44, n. 3, p. 158-163, 2000.

SHAZLY, A.B., Mu, H., Liu, Z., El-Aziz, M. A., Zeng, M., Qin, F., Zhang, S., He, Z., Chen, J. Release of antioxidant peptides from buffalo and bovine caseins: Influence of proteases on antioxidant capacities. **Food chemistry**. 274: 261-267, 2019.

SHEN SW, Chahal B, Majumder K, You SJ and Wu JP, Identification of novel antioxidative peptides derived from a thermolytic hydrolysate of ovotransferrin by LC-MS/MS. **J Agric Food Chem** 58:7664–7672, 2010

SILVA, A. C. C., Silva, N. A., Pereira, M. C. S., & Vassimon, H. S. Alimentos contendo ingredientes funcionais em sua formulação: revisão de artigos publicados em revistas brasileiras. **Conexão Ciência (Online)**, 11(2), 133-144, 2016.

SOARES RA, Mendonça S, de Castro L, Menezes AC, Arêas JA. Major peptides from amaranth (*Amaranthus cruentus*) protein inhibit HMG-CoA reductase activity. **Int J Mol Sci**. 16:4150– 60, 2015.

SOHAIB, M., Anjum, F. M., Sahar, A., Arshad, M. S., Rahman, U. U., Imran, A., & Hussain, S. Antioxidant proteins and peptides to enhance the oxidative stability of meat and meat products: A comprehensive review. **International Journal of Food Properties**, 20(11), 2581–2593, 2016.

SOUZA-SOARES, L. D., & SIEWERDT, F. **Aves e ovos**. Pelotas: Editora da Universidade UFPEL.35-42, 2005

ST. ANGELO, Allen J. et al. Lipid oxidation in foods. **Critical Reviews in Food Science & Nutrition**, v. 36, n. 3, p. 175-224, 1996.

STEFANOVIĆ, A.B.; Jovanović, J.R.; Grbavčić, S.Ž.; Šekuljica, N.Ž.; Manojlović, V.B.; Bugarski, B.M.; Knežević-Jugović, Z.D. Impact of ultrasound on egg white proteins as a pretreatment for functional hydrolysates production. **European Food Research and Technology**. 239: 979-993, 2014.

STEVENS, L. Egg white proteins. **Comp. Biochem. Physiol.** 100: 1-9, 1991.

STRINGUETA PC, AMARAL MPH, BRUMANO LP, PEREIRA MCS, PINTO MAO. Public Health Policies and Funcional Property Claims for Food in Brazil **Structure and Function of Food Engineering**. Croatia: [s.n.], Cap. 12, p. 307-336, 2012.

STRIXNER, T.; KULOZIK, U. Egg proteins. In **Handbook of food proteins** (pp. 150-209), 2011.

SUCUPIRA, Natália Rocha et al. Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos. **Journal of Health Sciences**, v. 14, n. 4, 2015.

SUN J, He H, Xie BJ. Novel antioxidant peptides from fermented mushroom *Ganoderma lucidum*. **J Agric Food Chem** ;52:6646–52, 2004

SUN, S.G.; Niu, H.H.; Yang, T.; Lin, Q.L.; Luo, F.J.; Ma, M.H. 2014 Antioxidant and anti-fatigue activities of egg white peptides prepared by pepsin digestion. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 94: 3195-3200, 2014.

TAEQ (2017). TAEQ – Conquiste sua vida, Grupo Pão de Açúcar. Disponível em :[https://www.conquistesuavida.com.br/ingrediente/ovo\\_i542670/1#](https://www.conquistesuavida.com.br/ingrediente/ovo_i542670/1#). Acesso em Janeiro de 2019

TEE, E.-S. Functional Foods in Asia: Current Status and Issues. **International Life Sciences Institute (ILSI)**, 2008.

TSUGE, Y., Shimoyamada, M., and Watanabe, K. Binding of egg white proteins to viruses. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 60: 1503-1504, 1996.

TSUGE, Y., Shimoyamada, M., and Watanabe, K. Bindings of ovomucin to Newcastle disease virus and anti-ovomucin antibodies and its heat stability based on binding abilities. **J. Agric. Food. Chem.** 45: 4629-4634, 1997.

TURK, Boris; TURK, Vito; TURK, Dušan. Structural and functional aspects of papain-like cysteine proteinases and their protein inhibitors. **Biological chemistry**, v. 378, n. 3-4, p. 141-150, 1997.

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

ULUKO, H., Zhang, S., Liu, L., Tsakama, M., Lu, J., & Lv, J. Effects of thermal, microwave, and ultrasound pretreatments on antioxidative capacity of enzymatic milk protein concentrate hydrolysates. **Journal of Functional Foods**, 18, 1138-1146, 2015.

Unión Nacional de Avicultores (UNA). 2018. Situación de la avicultura mexicana. Disponível em <http://www.una.org.mx/index.php/panorama/situacion-de-la-avicultura-mexicana>.

UniProt® . Disponível em <https://www.uniprot.org/>. Acesso em julho de 2018

United States Department of Agriculture Agricultural Research Service (USDA).2018. USDA Food Composition Databases.Disponível em [https://ndb.nal.usda.gov/ndb/search/list?SYNCHRONIZER\\_TOKEN=629477ab-30bd-4c63-98b784b89c9f3f2f&SYNCHRONIZER\\_URI=%2Fndb%2Fsearch%2Flist&qt=&qlookup=Egg%2C+raw%2C+fresh&ds=&manu=](https://ndb.nal.usda.gov/ndb/search/list?SYNCHRONIZER_TOKEN=629477ab-30bd-4c63-98b784b89c9f3f2f&SYNCHRONIZER_URI=%2Fndb%2Fsearch%2Flist&qt=&qlookup=Egg%2C+raw%2C+fresh&ds=&manu=) Acesso em Janeiro de 2019.

VALENTIM IB, Goulart MOF, Silva CA, Bechara EJH, Trevisan MTS. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**;32(3):689-702, 2009.

VAN DER PLANCKEN, I., Van Remoortere, M., Indrawati, Van Loey, A., &Hendrickx, M. E. Heat-induced changes in the susceptibility of egg white proteins to enzymatic hydrolysis: a kinetic study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 51: 3819-3823, 2003

VIDAL, A. M.; DIAS, D. O.; MARTINS, E. S. O.; OLIVEIRA, R. S.; NASCIMENTO, R. M. S.; CORREIA, M. G. S. A ingestão de alimentos funcionais e sua contribuição para a diminuição da incidência de doenças. **Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 1, n.15, p. 43-52 , 2012.

WANG J, Wang J, Liu B, Lin S, Zhao P, Liu J, Jones G, Huang H-C. Effects on DPPH inhibition of egg-white protein polypeptides treated by pulsed electric field technology. **Journal Science Food Agriculture** .93:1641–8, 2013.

WANG, T. Y., C. H. Hsieh, C. C. Hung, C. L. Jao, M. C. Chen, and K. C. Hsu. Fish skin gelatin hydrolysates as dipeptidyl peptidase IV inhibitors and glucagon-like peptide-1 stimulators improve glycaemic control in diabetic rats: a comparison between warm- and cold-water fish. **Journal of Functional Foods** 19:330–40, 2015.

WANG, Tzu-Yuan et al. A study to evaluate the potential of an in silico approach for predicting dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activity in vitro of protein hydrolysates. **Food chemistry**, v. 234, p. 431-438, 2017.

WATANABE, K., Tsuge, Y., Shimoyamada, M., Onizuka, T., Niwa, M., Ido, T., Tsuge, Y., Amino acid sequence of alpha-ovomucin in hen egg white ovomucin deduced from cloned cDNA. **DNA Seq.** 15, 251e261, 2004

WINTERBOURN CC. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. **Nat Biol Chem** . 4:278-86, 2008

YAMADA, Y. The contributions of poultry science to society. **Worlds Poult.Sci. J.** 44, 172–178, 1988.

YAZDI, M., A. Asoodeh, and J. Chamani. A novel antioxidant and antimicrobial peptide from hen egg white lysozyme hydrolysates. **Journal of Functional Foods** 4(1):278–86, 2012.

YEHYE, W. A., RAHMAN, N. A., ARIFFIN, A., HAMID, S. B. A., ALHADI, A. A., KADIR, F. A., YAEGHOobi, M. Understanding the chemistry behind the antioxidant activities of butylated hydroxytoluene (BHT): A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 101, p. 295-312, 2015.

YIM MH, LEE JH. Functional properties of fractionated soy protein isolates by proteases from Meju. **Food Sci Biotechnol** . 9:253–7, 2000.

YOKOTA, T., Ohishi, H., and Watanabe, K. In vitro studies of cytotoxic effect on sarcoma 180 cells of  $\beta$ -subunit from egg white ovomucin. **Food Sci. Technol. Res.** 5: 273-278, 1999.

YOU SJ, Udenigwe CC, Aluko RE and Wu JP, Multifunctional peptides from egg white lysozyme. **Food Res Int** 43:848–855 (2010)

YOU, S.-J., & Wu, J. Angiotensin-I Converting Enzyme Inhibitory and Antioxidant Activities of Egg Protein Hydrolysates Produced with Gastrointestinal and Nongastrointestinal Enzymes. **Journal of Food Science**, 76(6), C801–C807, 2011

YU Z, Yin Y, Zhao W, Yu Y, Liu B, Liu J, et al., Novel peptides derived from egg white protein inhibiting alpha-glucosidase. **Food Chemistry**. 129:1376–1382, 2011.

YU, Z., W. Zhao, J. Liu, J. Lu, and F. Chen. QIGLF, a novel angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptide from egg white protein. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 91(5):921–6, 2011

YU, Z., Yin, Y., Zhao, W., Chen, F., & Liu, J. Application and bioactive properties of proteins and peptides derived from hen eggs: opportunities and challenges. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 94(14), 2839–2845, 2014.

ZAMBROWICZ, A., Pokora, M., Setner, B., Dąbrowska, A., Szoltysik, M., Babij, K., Szewczuk, Z., Trziszka, T., Lubec, G., and Chrzanowska, J. Multifunctional peptides derived from an egg yolk protein hydrolysate: Isolation and characterization. **Amino Acids**. 47: 369-380, 2015.

ZAVAREZE, E. D. R., Silva, C. M., Mellado, M. S., & Hernandez, C. P. Funcionalidade de hidrolisados proteicos de cabrinha (*Prionotus punctatus*) obtidos a partir de diferentes proteases microbianas. **Quim. Nova**, Vol. 32, No. 7, 1739-1743, 2009.

ZENEZINI Chiozzi R, Capriotti AL, Cavaliere C, La Barbera G, Piovesana S, Samperi R, et al. Purification and identification of endogenous antioxidant and ACE-inhibitory peptides from donkey milk by multidimensional liquid chromatography and nanoHPLC-high resolution mass spectrometry. **Anal Bioanal Chem**. 408:5657–66, 2016.

ZERAIK, M. L. et al. Maracujá : um alimento funcional ? Passion fruit : a functional food ? **Revista brasileira de farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 459–471, 2010.

ZHAO, Lina; WANG, Shaoyun; HUANG, Yifan. Antioxidant function of tea dregs protein hydrolysates in liposome–meat system and its possible action mechanism. **International journal of food science & technology**, v. 49, n. 10, p. 2299-2306, 2014.

ZHAO, Y., Chen, Z., Li, J., Xu, M., Shao, Y., & Tu, Y. Formation mechanism of ovalbumin gel induced by alkali. **Food Hydrocolloids**. 61: 390-398, 2016.

ZOU, T. B., He, T. P., Li, H. B., Tang, H. W., & Xia, E. Q. The structure-activity relationship of the antioxidant peptides from natural proteins. **Molecules**, 21(1), 72, 2016.

## APÊNDICE

Nesta seção foram inseridos os gráficos da análise da atividade antioxidante (ABTS e ORAC) dos hidrolisados por pepsina e a tabela de peptídeos obtidos pela hidrólise *in silico* da das proteínas da clara de ovo, pelas enzimas Alcalase, pepsina e papaína.

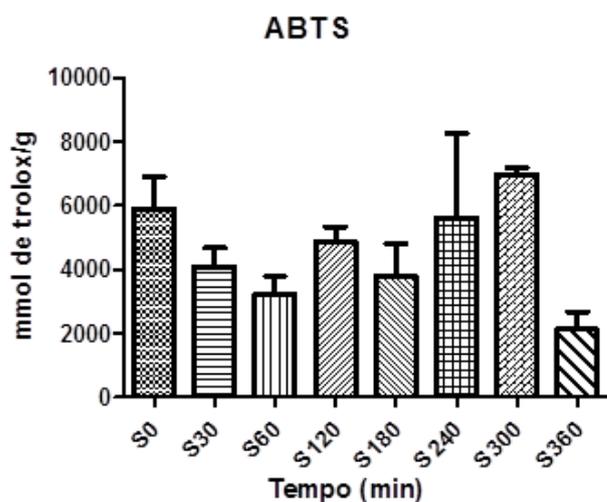


Figura1 Avaliação antioxidante dos hidrolisados de Pepsina pelo método de ABTS em todos os tempos de hidrólise sem incremento de tempo.

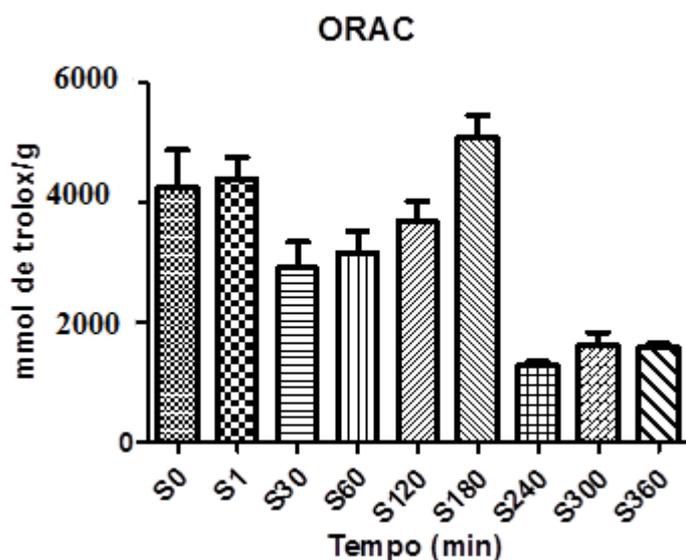


Figura 2: Avaliação antioxidante dos hidrolisados de Pepsina pelo método de ORAC em todos os tempos de hidrólise.

Tabela 1. Lista dos Peptídeos sequenciados e identificados pelo programa BIOPEP® como tendo atividade antioxidante

Enzima	Peptídeos
Papaína	SFWIFCLIWSFCK DSCGCDIGGDCECMCDIAIVYAMAACLDK CSQQHPSTECQSMQTYAALCGLHGICVDWR PICGTDGVTYTNDCLLCAYSIEFGTNISK HHDETGCCVFEQCICSGWGNEHYVTFDGTYYHFK SDFHLFGPPGK PCGAPCLK TCSNPEYSCSSHCTYGCFPEGTVLDDISK VNPIPYYESCVSDFCGCDSVGDCECFCTSVAAYAR NAPYSGYSGAFHCLK SAGWNIPIGTLHR PCNCPNQYK APCTDGCFCPPGTILDDLGGK ICSCGSIYMNNFIVK CSANQIYECEGSPCIK FHGVCTYILMK ELPCPGR IVSDGNGMNAWVAWR FNFHGNCHYVLAK CGNAFCGPNGMIIETFIPCSTLSVPAQEQLMQPVTSAPLLSTEATPCFCTDNGQLIQMGENVSLPMNISGHCA YSICNASCQIELIWAECK CESGVCADGLYENLDGR TAGWVIPMGLIHR FDFLGDCDYILAQDFCPNNMDAGTFR DCAAAGMTLK CGNILYSLEGCYPECSPDK TPAICPVFCDYINPPDK SISYLGNTIILR FAQHWCALLSNTSSTFAACHSVVDPSVYIK CSTWGGGHFSTFDK TGSGGAYSYGSSVNCTWHYR VADLWLSVIPEAGLR ELCYQECPSNMEYMECGNSCADTCADPER TPEFCPVYCEYYNSHR DSNVNWNLLK FWIHIDNYYCGAADGAICSMSELLIFHSNSLVILTQAK
Alcalase	RW
Pepsina	CSVGKCSANQIYECEGSPCIKTCSNPEYSCSSHCTYGCF SACHNKVNRMPYYEACVRDSCGCDIGGDCECMCDIAIVYAMAACLDK MMF

<p>HGICVDWRGQTNGQCEATCARDQVYKPCGEAKRNTCF NGETYAPGDTMKAACRTCKCTMGQWNCKEL SSDITASVNC AKKIVSDGNMGNAWVAWRNRCKGTDVQAWIRGCR L YKPGETIRVDCNTCTCNKRQWNCTDNPCKGTCTVYGNGHYMSF CTSVAAYARSCSTAGVCINWRTPAICPVF QGVYSSGGTYSTPCQNCTCKGGHWSCISL DGGLVYTAGVCGLVPVMAERYDDESQCSKTDERPASYFAVAVARKDSNVNWN NL DGGGCIPKDQCPCVHGGHF PMNISGHCAYSICNASCQIEL ECHPTDIPIEGCNC PKGMYL KPGAVVPKSSCEDCVCTDEQDAVTGTNRIQCVPVKCQTTCQQGF SLGIAAVCF AAPPKSVIRWCTISSPEEKCNL IYF KNVLVTLGRTTIKICSCGSIYMNNF PFGKYNNNTMGL CSTWGGGHF ECQCICSGWGNEHYVTF CKVQIAPMEGCGCPEGTYL YKPCGAPCL FGPPGKKDPVL HGNCHYVLAKNTDDTFV VIGEIIQCGTSKTM TCL CDYYNPPDKHEWF PLAALGKVFGRCELAAMKRHGL QNPAESCKAPKKYISCSDSL QGKTSCHTGLGRSAGWNIPIGTL</p>
---

## ANEXO

### ANEXO 1 – Lista de aminoácidos e seus respectivos símbolos

---

A	Ala	Alanina
B	Asx	Asparagina ou Aspartato
C	Cis ou Cys	Cisteína
D	Asp	Aspartato (Ácido aspartico)
E	Glu	Glutamato (Ácido glutâmico)
F	Fen ou Phe	Fenilalanina
G	Gli ou Gly	Glicina
H	His	Histidina
I	Ile	Isoleucina
K	Lis ou Lys	Lisina
L	Leu	Leucina
M	Met	Metionina
N	Asn	Asparagina
P	Pro	Prolina
Q	Gln	Glutamina (Glutamida)
R	Arg	Arginina
S	Ser	Serina
T	Tre ou Thr	Treonina
V	Val	Valina
W	Trp	Triptofano (Triptofana)
Y	Tir ou Tyr	Tirosina
Z	Glx	Glutamina ou Glutamato

---

Fonte:UFMG. Disponível em <http://labs.icb.ufmg.br/lbcd/grupo4/simbol.html> Acesso em Janeiro 2019