

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

Ticiane Carvalho Farias

**OBTENÇÃO ENZIMÁTICA DE HIDROLISADO PROTÉICO DE SOJA COM ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE PARA USO EM ALIMENTOS**

RIO DE JANEIRO

2017

Ticiane Carvalho Farias

**OBTENÇÃO ENZIMÁTICA DE HIDROLISADO PROTÉICO DE SOJA COM
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PARA USO EM ALIMENTOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro como requisito para a obtenção do grau de Mestre.

Orientação: Prof.^a Dr.^a Maria Gabriela Bello Koblitz

RIO DE JANEIRO

2017

F228 Farias, Ticiane Carvalho
OBTENÇÃO ENZIMÁTICA DE HIDROLISADO PROTÉICO DE
SOJA COM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PARA USO EM
ALIMENTOS / Ticiane Carvalho Farias. -- Rio de
Janeiro, 2017.
81 f.

Orientadora: Maria Gabriela Bello Koblitz.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do
Estado do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação
em Alimentos e Nutrição, 2017.

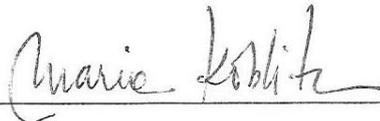
1. Peptídeos bioativos; . 2. Concentrado protéico
de soja; . 3. DPPH, ABTS, FRAP, ORAC, . 4.
Peroxidação lipídica; . 5. TBARs.. I. Koblitz, Maria
Gabriela Bello, orient. II. Título.

Obtenção enzimática de hidrolisado protéico de soja com atividade antioxidante para uso em alimentos

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro como requisito para a obtenção do grau de Mestre.

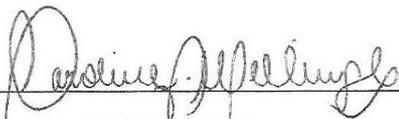
Aprovado em 11/04/2017

Banca examinadora



Dra Maria Gabriela Bello Koblitz

Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro



Dra. Caroline Mellinger Silva

Embrapa Agroindústria de Alimentos



Dra. Ana Iraidy Santa Brígida

Embrapa Agroindústria de Alimentos

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo.

Aos meus pais, Vera e Lincoln, pelo amor, apoio e dedicação que tiveram comigo não só durante o mestrado, mas em toda minha vida acadêmica.

A meu irmão, Lincoln, por estar sempre presente com seu amor.

A minha querida orientadora, Maria Gabriela Koblitz, pela atenção, paciência, confiança e ensinamentos ao longo deste trabalho.

Aos amigos Joel, Kelly e Gabriela, pela amizade, paciência, ajuda e pelas risadas, sem vocês não teria conseguido.

As amigas Mônica e Verônica, vizinhas de laboratório, pelas conversas, amizade, apoio e carinho, pelas noites de análise, pelas caronas, enfim, obrigada meninas.

Aos amigos, Erika, Deborah, Larissa, Luan, Patrícia, Raisal, Naruna e Jéssica, pela amizade, carinho e amor ao longo de tantos anos, vocês são muito importantes pra mim!

Aos meus chefes, Marcos, José e Juan, pela compreensão, paciência e apoio ao longo de todo o mestrado, e a todos do Café e Bar que vão estar pra sempre no meu coração.

As amigas do trabalho, Eliana, Munique, Erika e Josenilda, pela amizade, apoio, carinho, pelas conversas, conselhos e risadas diárias. Vocês fizeram parecer mais leve!

A toda a minha família que sempre me apoiou em todos os momentos transmitindo amor e carinho sempre

Ao meu namorado Thiago, pelo amor, paciência e dedicação ao longo do mestrado inteiro.

Aos professores da UNIRIO, pelos ensinamentos até hoje.

A todos que me ajudaram de alguma forma, sendo direta ou indiretamente, sou muito grata por tudo.

RESUMO

Os peptídeos bioativos são geralmente compostos de 3-20 aminoácidos, derivados de proteínas, que podem exercer atividades biológicas além do valor nutricional. Estudos têm demonstrado que peptídeos específicos, derivados de proteína de soja, exercem uma grande variedade de atividades biológicas, podendo ser anti-hipertensivos, antioxidantes entre outros. Este trabalho teve como objetivo a busca por peptídeos de concentrado proteico de soja, com propriedades antioxidantes que pudessem retardar a peroxidação em pescados, atuando assim, como conservante natural em alimentos. Um planejamento experimental foi realizado para avaliar a influência da adição de NaCl para melhora da solubilidade das proteínas e teor de concentrado protéico para melhora do rendimento de hidrólise. Os valores otimizados foram 2,7% de concentrado protéico de soja e 2,0M de NaCl. A hidrólise foi realizada com a enzima papaína, os peptídeos gerados foram separados por massa molecular através de ultra-filtração e analisados quanto à atividade antioxidante pelos métodos DPPH, ABTS, FRAP e ORAC e também quanto à capacidade de retardar a peroxidação lipídica através do método TBAR's, sobre amostras de sardinha. Para as análises da capacidade antioxidante foram encontrados valores semelhantes para todos os métodos utilizados: a amostra não hidrolisada apresentou maior atividade na presença de NaCl enquanto a fração contendo peptídeos de maior massa molecular (> 3kDa) apresentou maior atividade na ausência de NaCl. Quanto ao retardamento da peroxidação lipídica em modelo de alimento, a fração de hidrolisado contendo peptídeos de maior massa molecular também apresentou melhor resultado, ficando abaixo apenas da amostra congelada e da tratada com o antioxidante sintético BHT, confirmando a atividade antioxidante avaliada nos métodos utilizados. Como conclusão, observou-se que a produção de peptídeos bioativos de concentrado proteico da soja foi viável e que a atividade antioxidante do hidrolisado obtido foi comprovada por testes de capacidade antioxidante *in vitro*, mas também pelo retardamento da peroxidação lipídica, podendo assim atuar, como potencial aditivo natural na conservação de alimentos.

Palavras - chave: Peptídeos bioativos; concentrado protéico de soja; DPPH, ABTS, FRAP, ORAC, peroxidação lipídica, TBARs.

ABSTRACT

ENZYMATIC OBTAINMENT OF SOY PROTEIN HYDROLYSATES WITH ANTIOXIDANT ACTIVITY FOR USE IN FOOD PRODUCTS

Bioactive peptides are composed of 3 to 20 amino acids derived from proteins that can show biological activities in addition to their nutritional value. Studies have demonstrated that specific peptides derived from soy protein exert a wide variety of biological activities and may be antihypertensive, antioxidant, among others. This work aimed to obtain soybean peptides with antioxidant properties that could retard the peroxidation in fish, thus acting as a natural food preservative. An experimental design was performed to evaluate the influence of NaCl addition to improve protein solubility and protein concentrate content to improve the hydrolysis yield. The optimized values were 2.7% soybean protein concentrate and 2.0M NaCl. The hydrolysis was performed with papain and the peptides generated were separated by molecular mass by ultrafiltration and analyzed for their antioxidant activity by DPPH, ABTS, FRAP and ORAC methods as well as their ability to delay lipid peroxidation through TBAR's method, on sardine samples. Similar behavior was found for all the methods used: the non-hydrolyzed sample showed higher activity in the presence of NaCl and the fraction containing peptides of higher molecular mass (> 3kDa) showed higher activity in the absence of NaCl. As for the lipid peroxidation delay in the food model, the fraction of hydrolyzate containing higher molecular weight peptides also presented better results, being inferior only to the frozen sample and the one treated with the synthetic antioxidant BHT, confirming the antioxidant activity evaluated in the methods used. It may be concluded that the production of bioactive peptides from soybean derivatives was feasible and the antioxidant activity of the hydrolyzate obtained was proved by *in vitro* antioxidant capacity tests, but also by the evaluation of lipid peroxidation delay, thus acting as a natural additive in the conservation of foods.

Keywords: Bioactive peptides; Soy protein concentrate; DPPH, ABTS, FRAP, ORAC, lipid peroxidation, TBARs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Planta e semente de soja.

Figura 2 - Mapa da produção agrícola da soja no Brasil.

Figura 3 - Destino e usos da soja brasileira.

Figura 4 - Etapas do processamento industrial de concentrado protéico de soja.

Figura 5 - Reação entre DPPH• e um antioxidante para formar DPPH reduzido.

Figura 6 - Redução do ABTS por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.

Figura 7 - Redução do complexo Fe^{3+} - TPTZ a Fe^{2+} - TPTZ por meio de um antioxidante.

Figura 8 - Etapas de oxidação lipídica.

Figura 9 - Reação do teste de TBA entre o ácido 2-tiobarbitúrico e o malonaldeído, formando o composto colorido.

Figura 10 - Fluxograma da metodologia utilizada no presente estudo.

Figura 11 - Relação enzima/proteína utilizada na escolha da concentração de enzima.

Figura 12 – Gráfico de Pareto considerando as variáveis codificadas sem eliminar os valores não significativos.

Figura 13 - Gráfico da correlação entre os valores experimentais e os valores preditos pelo modelo sem eliminar os valores não significativos.

Figura 14 – Gráfico de Pareto considerando as variáveis codificadas eliminando os valores não significativos.

Figura 15 - Gráfico da correlação entre os valores experimentais e os valores preditos pelo modelo eliminando os valores não significativos.

Figura 16 - Gráfico de Pareto considerando as variáveis codificadas considerando os valores reais.

Figura 17 - Gráfico da correlação entre os valores experimentais e os valores preditos pelo modelo utilizando os valores reais.

Figura 18 - Superfície de resposta (A) e curvas de contorno (B) do efeito combinado da concentração de substrato (% CPS) e NaCl no rendimento de hidrólise (TCA%).

Figura 19 - Rendimento de hidrólise ao longo de 240 minutos, expressos em porcentagem de TCA.

Figura 20 - Atividade antioxidante pelo método de ABTS nas amostras de hidrolisado de CPS com e sem NaCl.

Figura 21 - Atividade antioxidante pelo método de DPPH nas amostras de hidrolisado de CPS com e sem NaCl.

Figura 22 - Atividade antioxidante pelo método de FRAP nas amostras de hidrolisado de CPS com e sem NaCl.

Figura 23 - Atividade antioxidante pelo método de ORAC nas amostras de hidrolisado de CPS com e sem NaCl.

Figura 24 - Reação de TBAR's em amostras de sardinha com adição de hidrolisados de proteína de soja.

TABELAS

Tabela 1 - Valor nutricional em 100g da soja cozida sem sal.

Tabela 2 - Composição em aminoácidos das proteínas das cultivares estudadas e do padrão da FAO.

Tabela 3 - Características de algumas proteases comerciais.

Tabela 4 - Dados da literatura sobre bioatividades de peptídeos da soja.

Tabela 5 - Variáveis independentes e os valores utilizados na hidrólise.

Tabela 6 - Matriz do planejamento experimental e respostas para otimização da hidrólise.

Tabela 7 - Distribuição dos ensaios com os patês de sardinha.

Tabela 8 - Resultados em rendimento do delineamento composto central rotacional

Tabela 9 – Coeficientes de regressão para a resposta Y_1 considerando as variáveis codificadas sem eliminar os valores não significativos.

Tabela 10 – Análise de variância para a resposta Y_1 considerando as variáveis codificadas sem eliminar os valores não significativos.

Tabela 11 – Dados preditos pelo modelo considerando as variáveis codificadas sem eliminar os valores não significativos.

Tabela 12 – Coeficientes de regressão para a resposta Y_1 considerando as variáveis codificadas.

Tabela 13 – Análise de variância para a resposta Y_1 considerando as variáveis codificadas eliminando os valores não significativos.

Tabela 14 – Dados preditos pelo modelo considerando as variáveis codificadas eliminando os valores não significativos.

Tabela 15 - Coeficientes de Regressão com valores reais para as variáveis independentes.

Tabela 16 – Análise de variância para a resposta Y_1 considerando as variáveis reais

Tabela 17 – Dados preditos pelo modelo considerando as variáveis decodificadas

Tabela 18. Rendimento da hidrólise nas condições otimizadas, expressos em % de massa.

Tabela 19. Sequencias de peptídeos encontradas nas amostras < 3 kDa

SUMARIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
TABELAS	v
1 - INTRODUÇÃO.....	1
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 – SOJA	3
2.1.1 - Composição da soja.....	4
2.2 - CULTIVO DA SOJA, UTILIZAÇÃO E COMÉRCIO.....	6
2.3 – ALIMENTOS FUNCIONAIS	9
2.3.1 – Antioxidantes	10
2.3.2 - Compostos bioativos presentes na soja	11
2.4 – HIDRÓLISE ENZIMÁTICA.....	13
2.5 - PEPTÍDEOS BIOATIVOS.....	14
2.5.1 – Peptídeos bioativos da soja obtidos por hidrólise ou fermentação	15
2.5.2 - Peptídeos antioxidantes	17
2.6 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	18
2.6.1 – Peroxidação lipídica	22
2.6.2 - Índice de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBAR's)	23
3 – OBJETIVOS	24
4 – MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1 – MATERIAL.....	25
4.2 – METODOLOGIA	25
4.2.1 - Otimização do rendimento de hidrólise por planejamento multivariável.....	26
4.2.2 - Determinação do teor de proteína solúvel em TCA	28
4.2.3 - Hidrólise utilizando papaína	28
4.2.4 – Fracionamento do hidrolisado por ultrafiltração	29
4.2.5 - Sequenciamento por espectrometria de massas	29
4.2.6 - Determinação da atividade antioxidante.....	29

4.2.6.1 – DPPH.....	29
4.2.6.2 – ABTS.....	30
4.2.6.3 – FRAP.....	30
4.2.6.4 – ORAC.....	30
4.2.7 – Teste de aplicação em modelo de alimento.....	31
4.2.7.1 - Preparo das amostras de sardinha.....	31
4.2.7.2 – Índice de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBAR's).....	32
4.3 – ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32
5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
5.1 – OTIMIZAÇÃO DO RENDIMENTO DE HIDRÓLISE POR PLANEJAMENTO MULTIVARIÁVEL.....	33
5.2 - DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNA E RENDIMENTO DA HIDRÓLISE	43
5.3 - SEQUENCIAMENTO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	43
5.4 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	44
5.5 – TESTE DE APLICAÇÃO EM MODELO DE ALIMENTO.....	48
6 – CONCLUSÃO.....	52
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

1 - INTRODUÇÃO

As proteínas são moléculas muito abundantes e com grande diversidade de funções nos sistemas vivos, dentre elas reparação e nutrição dos músculos e reconstrução de tecidos, promovendo o seu crescimento (NETO et al., 2016). Em alimentos, são conhecidas por proporcionarem aminoácidos essenciais e, além disso, contribuem para as propriedades físico-químicas e sensoriais. Nos últimos anos, as proteínas dos alimentos têm ganhado cada vez mais destaque, especialmente devido à rápida expansão do conhecimento sobre peptídeos fisiologicamente ativos. Este conhecimento vem estimulando o interesse da academia em identificar e caracterizar peptídeos bioativos a partir de fontes vegetais e animais (HARVEY e FERRIER, 2012; SARMADI et al., 2010).

Os peptídeos bioativos são geralmente de baixa massa molecular (3-20 aminoácidos), derivados de proteínas e podem exercer atividades biológicas, além do esperado valor nutricional. Quando administrados oralmente, como parte da dieta, os peptídeos bioativos podem afetar os principais sistemas do corpo (KORHONEN, 2009; CHAKRABARTI et al., 2014). Esses peptídeos são facilmente absorvidos pelo organismo e podem apresentar diversas formas de atividade, como: atividade antioxidante, hipotensiva, hipocolesterolêmica, moduladora do sistema imunológico e anticarcinogênica/antitumoral (MEIJA; LUMEN, 2006).

A soja (*Glycine max*) é, economicamente, a leguminosa mais importante do mundo, fornecendo proteína vegetal para milhões de pessoas e ingredientes para centenas de produtos. Atualmente, existem inúmeros produtos no mercado que são baseados em soja ou contém ingredientes de soja. As proteínas de soja são fontes abundantes e relativamente baratas de proteína com elevado valor nutritivo e excelentes propriedades funcionais (MEIJA; LUMEN, 2006; SINGH e HATI, 2014). Estudos têm demonstrado que peptídeos específicos, derivados de proteína de soja, exercem uma grande variedade de atividades biológicas, podendo ser anti-hipertensivos, antitrombóticos, inibidores da dipeptidil-peptidase IV, opióides e antioxidantes (ZHANG et al., 2010; SINGH e HATI, 2014).

O interesse da comunidade científica em relação aos antioxidantes naturais e peptídeos bioativos tem aumentado muito na última década (SÁNCHEZ-RIVERA et al., 2014). Vários ingredientes ou aditivos são adicionados aos alimentos com o objetivo de modificar suas características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais (BRASIL, 2008). A utilização de aditivos visa fornecer grande variedade de produtos, além de melhorar a aparência, a

aceitabilidade do produto e principalmente a vida de prateleira. A oxidação lipídica resulta em sabores e odores desagradáveis, além das mudanças na cor, fatores que limitam a validade comercial do produto. A indústria atualmente utiliza-se de métodos de conservação baseados em antioxidantes sintéticos, no entanto, a preocupação do consumidor vem aumentando quanto aos efeitos nocivos de tais aditivos, levando produtores a buscarem conservadores naturais (LIMA, 2011; CHRIST-RIBEIRO et al., 2016; VEECK et al., 2013).

Este trabalho visou à busca por peptídeos de soja com propriedades antioxidantes que pudessem retardar a peroxidação em pescados, classe de alimentos com alto teor de ácidos graxos insaturados, podendo vir a atuar como aditivo natural em alimentos.

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – SOJA

A soja pertence ao reino Plantae, filo/divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, ordem Fabales, família Fabaceae (Leguminosae), subfamília Faboideae (Papilionoideae), gênero *Glycine*, espécie *Glycine max* e forma cultivada *Glycine max* (L.) Merrill (MARTINEZ, 2011; NEVES, 2011). O sistema radicular é pivotante, com raiz principal bem desenvolvida e raízes secundárias em grande número, ricas em nódulos de bactérias *Rhizobium japonicum*, fixadoras de nitrogênio atmosférico. As sementes possuem forma arredondada achatada ou alongada. A coloração é variada e o comércio prefere as sementes de cor amarela. O tamanho também é variado (MISSÃO, 2006).



Figura 1 – Planta e semente de soja.

Fonte: APROSOJA, 2016.

A história antiga da soja é obscura. A literatura chinesa relata que era bastante cultivada e utilizada como alimento centenas de anos antes de os primeiros registros serem feitos. O local de origem da soja não é definitivamente conhecido e existe discordância entre os autores. Hymowitz (1970) concluiu que foi domesticada na metade norte da China, por volta do século XI A.C. (BONATO, 1987). Todos indicam, no entanto que o centro de diversidade genética é o leste da Ásia.

Sua aparição no Brasil deu-se no início do século XX, mas seu impulso maior aconteceu em meados dos anos 1970, em razão da grande quebra de safra na Rússia e a incapacidade dos Estados Unidos suprirem a demanda mundial de soja. Nesta época o Brasil

superou até a China, que era a segunda maior produtora mundial de soja com 8.500.000 toneladas, ficava logo atrás dos Estados Unidos, o maior produtor mundial até os dias de hoje, junto com o Brasil (MISSÃO, 2006).

2.1.1 - Composição da soja

Em média, a soja é constituída de 40% de proteína, 35% de carboidratos, 20% de lipídios (Tabela 1) (OLIVEIRA, 2010). As principais proteínas de soja são conhecidas como β -conglucina e glicina, que respondem por 65% a 80% das proteínas totais (MEIJA, LUMEN, 2006). As proteínas são essenciais na dieta humana e seu valor biológico e nutricional depende da quantidade, digestibilidade, absorção e utilização dos aminoácidos que a compõem em cada alimento. Devido ao elevado teor de proteínas, a soja apresenta grande interesse para a alimentação, como substituta da carne, estando presente nas dietas vegetarianas (PENHA, 2007). Produtos de proteínas de soja para alimentação humana incluem: flocos desengordurados, grãos e farinha, concentrado protéico, proteína isolada e os produtos protéicos texturizados (MEIJA, LUMEN, 2006).

Tabela 1. Valor nutricional em 100g da soja cozida sem sal.

Componente	Valor
Energia (kcal)	141
Água (g)	67
Proteína (g)	12,5
Lipídeos (g)	7,5
Saturada (g)	1
Monoinsaturada (g)	1,7
Polinsaturada (g)	4,5
Carboidratos (g)	5,6
Vitamina E (mg)	1
Cálcio (mg)	82
Ferro (mg)	2,6
Magnésio (mg)	84
Potássio (mg)	513

Fonte: STRÖHER, 2010.

Liu (1997) observou que existe uma variação significativa na digestibilidade da proteína de soja em humanos de acordo com o alimento de soja. Aqui estão listados alguns, a partir de sua porcentagem de digestibilidade: soja tostada, natto¹, tofu² resfriado, grãos de soja cozidos, tofu congelado, yuba³: 78%; 90%; 91%; 92% 93% e 100%, respectivamente. A

¹ Soja cozida fermentada com *Bacillus natto*

² Queijo de soja

³ Película que se forma na superfície do leite de soja quando este é fervido

proteína de yuba é desenovelada, tem a estrutura “aberta” por meio de ligações hidrofóbicas com lipídeos. Pode-se observar então, que a conformação das proteínas nos produtos de soja pode exercer um importante papel na sua digestibilidade, conforme seu produto final (MONTEIRO, 2000).

Vieira (1999) estudou a composição de aminoácidos de seis cultivares de soja, sendo IAS-4, BR-16 e Iguazu provenientes do Rio Grande do Sul, EMBRAPA-4 e Davis, do Paraná e IAS, do Estado de São Paulo, onde todas as amostras apresentaram quantidade satisfatória de aminoácidos comparados com a recomendação diária, podendo ser consideradas como fonte de proteína de alta qualidade para a alimentação humana, conforme mostrado na Tabela 2.

Tabela 2. Composição em aminoácidos das proteínas das cultivares estudadas e do padrão da FAO (1985).

Aminoácidos	FAO (g/100 g de proteína)			Cultivares (g/100 g de proteína)					
	2-5 anos	10-12 anos	Adulto	IAS-4	EMBRAPA-4	Davis	BR-16	Iguazu	IAS-5
Essenciais									
Histidina	1,9	1,9	1,6	1,9	1,8	1,9	2,0	2,4	2,4
Isoleucina	2,8	2,8	1,3	4,1	3,5	3,8	3,7	4,1	4,0
Leucina	6,6	4,4	1,9	7,8	7,1	7,4	7,3	7,8	7,9
Lisina	5,8	4,4	1,6	6,4	5,6	5,8	6,0	6,8	6,9
Metionina	-	-	-	1,3	1,2	1,3	1,3	1,4	1,3
Cisteína	-	-	-	2,5	2,0	2,5	2,2	2,4	2,3
Sulfurados (Met + Cys)	2,5	2,2	1,7	3,8	3,2	3,8	3,5	3,8	3,6
Fenilalanina	-	-	-	6,2	6,1	6,2	6,0	6,5	6,7
Tirosina	-	-	-	3,2	3,0	3,3	3,1	3,4	3,5
Aromáticos (Phe + Tyr)	6,3	2,2	1,9	9,4	9,1	9,5	9,1	9,9	10,2
Treonina	3,4	2,8	0,9	3,9	3,5	3,9	3,8	4,0	4,1
Triptofano	1,1	0,9	0,5	1,7	1,6	1,5	1,6	1,5	1,5
Valina	3,5	2,5	1,3	4,1	4,1	4,3	4,1	4,6	4,4
Total AAE ¹	33,9	24,1	12,7	43,1	39,5	41,9	41,1	44,9	45,0
Não essenciais									
Arginina	-	-	-	7,4	7,4	6,8	6,8	7,3	7,2
Alanina	-	-	-	4,3	3,8	4,0	3,9	4,2	4,4
Ácido aspártico	-	-	-	12,8	13,1	14,2	13,7	14,6	14,7
Ácido glutâmico	-	-	-	18,3	20,9	22,1	20,7	23,6	23,3
Glicina	-	-	-	3,7	3,6	3,6	3,4	3,8	3,9
Prolina	-	-	-	8,3	7,5	7,9	7,6	8,0	8,7
Serina	-	-	-	5,3	4,8	5,2	5,0	5,5	5,0

¹ Aminoácidos essenciais.

Fonte: VIEIRA, 1999.

O grão de soja contém ainda menos de 1% de amido, 5% de cinzas e 4,5% de fibras. A importância da fibra alimentar na dieta tem recebido muita atenção em diversas partes do mundo, principalmente pelos efeitos comprovados como controle glicêmico no auxílio à diabetes tipo 2; diminuição dos lipídeos séricos e melhoria do trânsito gastrointestinal

(MELLO e LAAKSONEN, 2009; BERNAUD e RODRIGUES, 2013; SANT'ANNA e FERREIRA, 2016). Já a casca da soja contém por volta de 87% de fibra bruta, sendo formada por celulose, hemicelulose e lignina (ERICKSON, 1995; MARTINEZ, 2011).

2.2 - CULTIVO DA SOJA, UTILIZAÇÃO E COMÉRCIO

Segundo dados recentes da EMBRAPA (2016), a produção de soja no Brasil na safra 2015/2016, foi de 95,63 milhões de toneladas, com uma área plantada de 33,1 milhões de hectares e uma produtividade de 2.882 Kg/ha, havendo acréscimo de aproximadamente 5% na área plantada da soja e diminuição de aproximadamente 4% na produção em relação à safra de 2014/2015. O Brasil é o segundo maior produtor de soja no mundo, tendo o Mato Grosso, Paraná e Rio Grande do Sul como os estados de maior produção (FIGUEIREDO, 2005; EMBRAPA, 2016). A produção mundial de soja que, em 1990, era de 108,453 mil toneladas, em 2004, chegou a 206,462 mil toneladas, ou seja, um crescimento acumulado em torno de 90%. Os principais produtores mundiais de soja são os EUA, com produção de 106,9 milhões de toneladas na safra 2015/16; Brasil, com aproximadamente 95,6 milhões ton. e Argentina, com 56,8 milhões de ton., que juntos respondem por mais de 80% do total produzido na safra 2015/2016 (USDA, 2016).

A soja encontrou no Brasil excelentes condições para uma rápida expansão. Diversos fatores contribuíram para a sua fixação e desenvolvimento. Entre muitos, podem ser destacados: fácil adaptação das variedades e das técnicas de cultivo oriundas do sul dos Estados Unidos; cultura utilizada em sucessão ao trigo, possibilitando o aproveitamento da mesma área, das máquinas e equipamentos, dos armazéns e da mão de obra; condições favoráveis de mercado, especialmente do externo; carência de óleos vegetais comestíveis para substituir a gordura animal; desenvolvimento rápido do parque de processamento, garantindo a total absorção da matéria-prima, além de fácil negociação que é fator preponderante desta cultura para obtenção de divisas para o país (BONATO, 1987; MISSÃO, 2006).

A estimativa realizada pela USDA (2016) é de que a safra brasileira de soja 2016/17 tenha um aumento na produção de 5,5 milhões toneladas, em relação à safra 2015/16. A Figura 2 mostra a distribuição da produção de soja no Brasil.

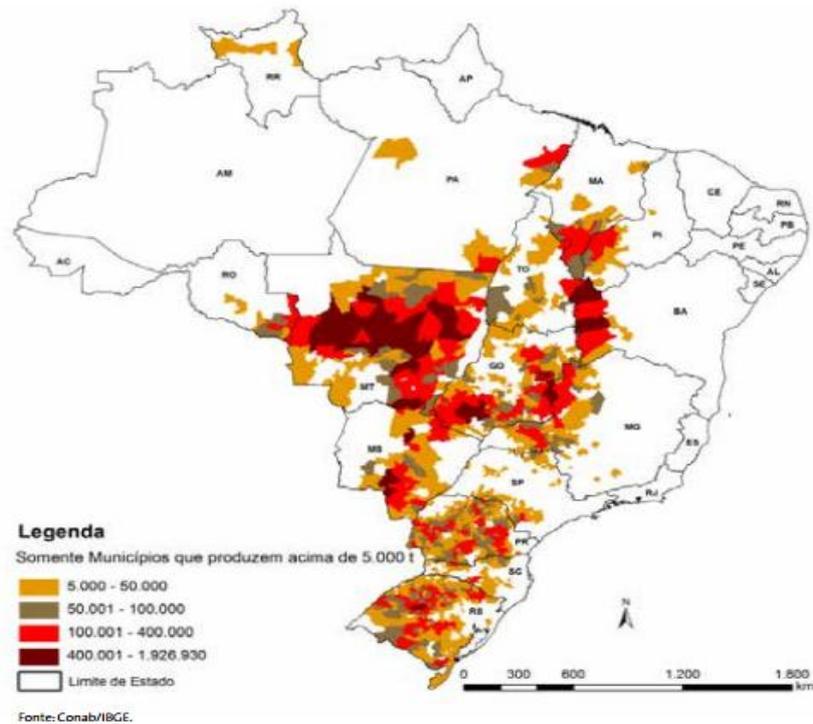


Figura 2. Mapa da produção agrícola da soja no Brasil.

Fonte: CONAB, 2016.

A utilização da soja é muito conhecida pela extração do óleo vegetal e geração de seu subproduto, o farelo. Porém povos orientais, por conhecerem muito melhor o grão e sua utilidade, criaram variadas formas de utilização (MISSÃO, 2006). A soja é um grão muito versátil, que dá origem a produtos e subprodutos muito usados pela agroindústria e indústrias química e de alimentos. Na alimentação humana, a soja entra na composição de vários embutidos, em chocolates, temperos para saladas, entre outros. A maior parte do óleo é destinada para o consumo humano e para produção de biodiesel, já o farelo é destinado para alimentação animal. Do óleo extraído do grão são produzidos óleo de cozinha, tempero de saladas, margarinas, gordura vegetal e maionese. Do processo de obtenção do óleo refinado de soja obtém-se a lecitina, um agente emulsificante, usado na produção de salsichas, maioneses, sorvetes, entre outros (EMBRAPA, 2013; APROSOJA, 2016).

A farinha e o farelo desengordurado de soja são os produtos industrializados mais importantes, sendo usados tanto para enriquecer alimentos, melhorando sua composição nutricional, como na obtenção de concentrados e isolados ricos em proteína. Grande interesse é demonstrado pelo farelo de soja, por sua disponibilidade como subproduto da indústria de óleo e por conter, no mínimo, 47% de proteína. Embora a maior parte do farelo de soja ainda seja destinada a rações animais, muitos processos têm sido desenvolvidos com o objetivo de

obter produtos mais valorados, destinados diretamente ao consumo humano ou à produção de ingredientes protéicos (aditivos alimentares), como mostra a Figura 3 (APROSOJA, 2016).



Figura 3. Destino e usos da soja brasileira.

Fonte: APROSOJA, 2016

Os principais subprodutos da industrialização da soja são o farelo (45% de proteína bruta e 45% de carboidratos), a farinha (65% de proteína bruta e 35% de carboidratos), o concentrado protéico (70% de proteína bruta e 25% de carboidratos) e o isolado protéico (90% de proteína bruta e 5% de carboidratos), sendo o concentrado a forma mais usada na alimentação (SMITH e CIRCLE, 1972; CARVALHO et al., 2009; AGUIAR et al., 2016).

O concentrado proteico de soja (CPS) é obtido de grãos de alta qualidade, limpos e descascados, sendo removida a maior parte do óleo e de substâncias não protéicas e deve conter, no mínimo, 70% de proteína bruta, segundo a Resolução da ANVISA, 1978. Em seu processamento, o solvente é removido sem alterar as características funcionais das proteínas da soja por secagem em temperaturas baixas, gerando os chamados “flocos brancos”. A remoção dos carboidratos solúveis dos flocos brancos leva ao produto final, o concentrado protéico de soja. O método mais utilizado para o processamento do CPS é o método de extração, que é caracterizado, basicamente, pelo tratamento dos flocos brancos desengordurados de soja com solução aquosa de etanol a 70-90%; lavagem com água em pH=4,5 ou desnaturação protéica com calor úmido, antes da extração com água. São removidos durante o processo aproximadamente 90% dos oligossacarídeos da soja e uma

parte dos fatores anti-nutricionais, como ilustrado na Figura 4 (SOARES, 2014; FELIX, 2011). O CPS tem alto poder emulsificante e é bom absorvente de gorduras, possui alta solubilidade e dispersibilidade. A sua utilização na indústria alimentícia é amplamente difundida como “fortificante protéico” e base nutricional de alimentos liofilizados (UFRGS, 2016).

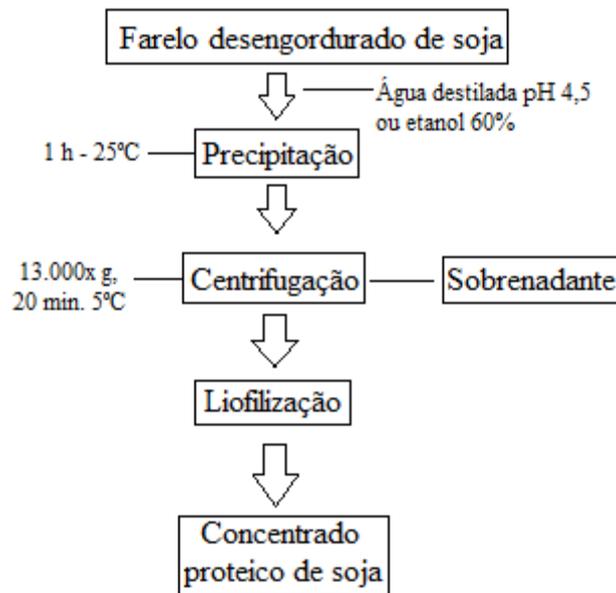


Figura 4. Etapas do processamento de concentrado protéico de soja. Adaptado de LUI e colaboradores (2003).

2.3 – ALIMENTOS FUNCIONAIS

A ANVISA define funcional como “aquele alimento ou ingrediente que, além das funções nutritivas básicas, quando consumido como alimentação normal, produz efeitos metabólicos e/ou fisiológicos que ajudam no benefício à saúde, devendo ser seguro para consumo sem acompanhamento médico, fazendo parte das nossas refeições diárias” (BRASIL, 1999).

Alimentos funcionais contêm substâncias capazes de modular as respostas metabólicas do indivíduo, resultando em maior proteção e estímulo à saúde. Promovem o bem-estar, prevenindo o aparecimento precoce de doenças degenerativas e ajudando na longevidade com qualidade de vida (PENHA, 2007). Para que os efeitos funcionais sejam percebidos, os compostos bioativos presentes nos alimentos, devem estar presentes em concentrações adequadas, preferencialmente incorporados no próprio alimento, inserido dentro da alimentação. O ideal seria o aumento do consumo de frutas, verduras, fibras e alimentos integrais pela população. Vários componentes dos alimentos podem atuar, em determinadas

concentrações, como substâncias funcionais. Dentre estes componentes podem ser citados algumas vitaminas, minerais essenciais, proteínas e peptídeos, ácidos graxos poliinsaturados da família ω -3 e componentes da fibra alimentar (SGARBIERI; PACHECO, 1999; VIDAL, et al., 2012).

2.3.1 – Antioxidantes

No organismo humano, a atividade metabólica normal produz constantemente radicais livres. Estas moléculas, geradas *in vivo*, reagem com DNA, RNA, proteínas e outras substâncias oxidáveis, promovendo danos que podem contribuir para o envelhecimento e a instalação de doenças degenerativas, como câncer, aterosclerose, artrite reumática, entre outras. A autooxidação dos ácidos graxos insaturados, componentes da membrana celular, é apontada por Ramarathnam et al. (1995) como o processo oxidativo que ocorre mais frequentemente no organismo humano (MELO, 2006).

Os radicais livres (RL) são definidos como qualquer espécie de existência independente, que contém um ou mais elétrons desemparelhados. São altamente reativos e instáveis, possuindo vida curta. A formação destas moléculas ocorre naturalmente no organismo de todos os seres vivos, devido à exposição ao oxigênio molecular. Os efeitos dos prejuízos causados pelo oxigênio variam de acordo com o organismo estudado, idade, estado fisiológico e dieta (SANTOS, 2001).

Os RL são responsáveis por modificações químicas de proteínas, lipídios, carboidratos e nucleotídeos, resultando em uma variedade de consequências biológicas, incluindo lesão tecidual, mutação, carcinogênese, comprometimento do sistema imunológico e morte celular. Níveis baixos de espécies reativas de oxigênio (EROs) são necessários para processos celulares tais como sinalização intracelular e defesa celular. Inversamente, altos níveis de EROs ou a incapacidade do sistema antioxidante de regular os níveis de EROs eficientemente, resulta em estresse oxidativo, que é definido como desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a capacidade do organismo para neutralizar os seus efeitos nocivos, através da reação química com moléculas antioxidantes, gerando danos diretos ou indiretos no corpo humano, incluindo a produção de peroxidação lipídica, danos ao DNA, RNA e modificações de proteínas. Estes processos têm sido relacionados com a patogênese de várias doenças sistêmicas como hipertensão, *diabetes mellitus*, hipercolesterolemia e também doença renal (SANTOS, 2001; MENON, et al., 2016; BELADI-MOUSAVI et al., 2016).

Antioxidantes são 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. Embora as defesas antioxidantes sejam diferentes de espécie para espécie, a presença da defesa antioxidante é universal em seres vivos. Os antioxidantes existem tanto em formas enzimáticas como não enzimáticas no ambiente intracelular e extracelular, e não se tornam radicais livres pela doação de elétrons, pois são estáveis em ambas as formas. Existem duas categorias básicas de antioxidantes, denominados sintético e natural (OLIVEIRA, 2011; NIMSE e PAL, 2015).

Antioxidantes sintéticos como o butilhidroxianisol (BHA) e o butilhidroxitolueno (BHT) são normalmente utilizados na indústria de óleos e de derivados lipídicos. Entretanto, estes compostos podem apresentar alguns efeitos prejudiciais à saúde (BOTTERWECK et al., 2000). Os autores WITSCHI e LOCK, 1978; TAKAHASHI e HIRAGA, 1978, têm demonstrado que essas substâncias podem causar efeitos adversos em ratos, atuando como agente promotor no desenvolvimento de adenoma. Com isso, os antioxidantes sintéticos devem ser testados para a segurança e devem ser aprovados para uso em alimentos. Os limites permitidos para o uso de antioxidantes variam muito de país para país (YEHYE et al., 2015). Nas últimas décadas houve um aumento significativo à preocupação de se obter substâncias naturais que tenham a mesma função e eficiência dos antioxidantes sintéticos (PASSOTTO et al., 1998).

2.3.2 - Compostos bioativos presentes na soja

A soja foi incluída entre os alimentos funcionais, como citado anteriormente, porque é fonte conhecida de proteína e o consumo diário de no mínimo 25 g de proteína de soja pode ajudar a reduzir o colesterol. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis (BRASIL, 2008). Evidências científicas, através de estudos em humanos, animais e sistemas de culturas de células, sugerem que as isoflavonas, especificamente a genisteína e a daidzeína, e as proteínas presentes na soja desempenham um papel importante na prevenção de doenças crônicas, apresentando um efeito anticancerígeno e atividade antioxidante. Com isso, estes componentes podem trazer benefícios no controle e prevenção de doenças como câncer, *diabetes mellitus*, osteoporose, manifestações da menopausa e doenças cardiovasculares devido a mecanismos como diminuição nos níveis de colesterol total decorrente do aumento na atividade de receptores das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (MORAIS, 2000; ZAKIR e FREITAS, 2015).

O consumo de alimentos à base de leguminosas, especificamente de soja, em países orientais tem sido associado às boas condições de saúde das populações. Comparações entre dietas e algumas doenças tem demonstrado a importância do consumo de alguns alimentos, entre os quais estão aqueles obtidos através da soja. Essas constatações têm sido associadas à presença de isoflavonas nesses alimentos (FERRARI, 2001).

A soja apresenta ainda, peptídeos bioativos naturalmente presentes na sua estrutura. Entre estes, a lunasina, um peptídeo de 43 aminoácidos, de ocorrência natural, dotado de atividade quimiopreventiva, isolado originalmente da soja e posteriormente encontrada em outras espécies de plantas, como a cevada e o trigo, é de longe o mais estudado e sua eficácia anticancerígena foi demonstrada em estudos utilizando culturas de células e em modelos experimentais de câncer de pele, em ratos e em células de mamíferos verificando-se o retardamento da transformação celular por carcinógenos químicos e pelos oncogênes virais RAS e E1A. Vários estudos indicaram o potencial anticancerígeno da lunasina e apoiam a recomendação de proteína de soja como um componente alimentar que pode ajudar na prevenção de câncer de mama (SINGH e HATI, 2014; MITCHELL et al., 2013; VIEIRA, 2014).

Além da lunasina, existem outros peptídeos naturalmente presentes na soja, como o inibidor de protease Bowman-Birk (BBI). Este inibidor, com peso molecular de 7,8 kDa, possui 71 aminoácidos e 7 ligações dissulfeto, é capaz de resistir à acidez do sistema digestivo e permanecer estável a 100° C por até 10 minutos. Manifesta o seu efeito anticancerígeno inibindo a protease responsável pela carcinogênese (LULE et al.,2015; VIEIRA, 2014).

As isoflavonas, também chamadas de isoflavonoides, pertencem à família dos polifenóis, que são compostos químicos fenólicos, e pertencem à classe dos fitoestrógenos devido a sua estrutura química ser bastante semelhante ao estrógeno humano. Comportando-se como estrógenos verdadeiros, tal como o 17 β -estradiol, ligando-se aos receptores de estrógeno, mas não causam os mesmos efeitos colaterais. Uma propriedade comum dos polifenóis é a atividade antioxidante. As concentrações destes compostos são relativamente maiores nas leguminosas e especialmente na soja, as principais isoflavonas encontradas na soja são a daidzeína, a genisteína e a gliciteína, que geralmente estão presentes de forma conjugada a glicosídeos em alimentos. Quando a soja e seus produtos são ingeridos, as isoflavonas presentes são hidrolisadas no intestino por glicosidases da microbiota, liberando as agliconas, que são as formas biologicamente ativas, e irão atuar beneficemente no organismo humano. As isoflavonas apresentam um efeito de equilíbrio nos níveis de

estrógenos endógenos, que são benéficos durante toda a vida da mulher (HIRAOKA, 2009; ZAKIR E FREITAS, 2015).

2.4 – HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

As proteases, enzimas responsáveis pela hidrólise de proteínas, compreendem um grupo de enzimas muito importantes na indústria, o que corresponde a cerca de 60% a 65% das enzimas comercializadas (SILVA et al., 2014). A Tabela 3 mostra as principais características de temperatura e pH das proteases comerciais mais utilizadas.

O processo enzimático é baseado no uso de combinações únicas ou diferentes de proteínases como pepsina, tripsina, quimotripsina, bromelina, papaína, alcalase, neutrase, flavourzyme e muitas outras. Os parâmetros críticos de hidrólise (temperatura, pH, solução aquosa ou tamponada) devem ser otimizados para cada substrato de proteína e cada enzima ou combinação de enzimas selecionadas e devem ser mantidos durante a proteólise para assegurar a libertação eficiente de peptídeos (ALUKO, 2015). A proteólise, além de diminuir o peso molecular, também aumenta o número de grupos ionizáveis e pode expor grupos hidrofóbicos, que podem alterar as interações físicas ou químicas no sistema (TAVANO, 2013).

Dentre as proteases comerciais existentes, a papaína (EC 3.4.22.2) pertence ao grupo das serina-proteases (classificadas assim devido à natureza química do sítio catalítico/mecanismo de ação), onde se incluem também a ficina, a bromelina e a protease de *Streptococcus* sp. entre outras. A papaína (obtida do mamão), a ficina (do figo) e a bromelina (do abacaxi) têm em comum o fato de serem muito estáveis em temperaturas entre 60 e 80 °C em pH neutro. A papaína e a ficina hidrolisam com igual eficiência substratos contendo resíduos de lisina, arginina e glicina (VIEIRA, 2007). A papaína cliva principalmente ligações internas da proteína (endopeptidase), ela contém Cys-His-Asn como uma tríade catalítica do seu sítio ativo envolvido na hidrólise de proteínas e assim retém a sua atividade catalítica após succinilação dos resíduos de lisina, que não estão envolvidos na geometria do sítio ativo. (CAETANO, 2012; TAVANO, 2013).

Tabela 3. Características de algumas proteases comerciais.

Enzima	Origem	Estabilidade	
		pH	Temperatura (°C)
Alcalase 0,6L	<i>B. licheniformis</i>	4<pH<11,5	50<T<60
Neutrase	<i>B. subtilis</i>	6<pH<8	45<T<55
Protease 660L	<i>B. subtilis</i>	7<pH<10	50<T<70
Fungal-Protease	<i>A. oryzae</i>	6<pH<9	45<T<55
	tripsina suína		30<T<60
P.E.M 25000 S ¹	tripsina bovina	6<pH<10	25<T<45
	quimiotrip. bovina		
	tripsina		
Corolase PP	quimiotripsina	7<pH<9	45<T<55
Corolase PS	<i>A. oryzae</i>	5<pH<7	50<T<60
Corolase 7089	<i>B. subtilis</i>	6<pH<8,5	55<T<60
Corolase 7092	<i>A. oryzae</i>	6<pH<9	35<T<45
Corolase 7093	<i>A. oryzae</i>	7<pH<9	40<T<50
Corolase 7107	<i>A. niger</i>	2<pH<3	30<T<50
Bromelina Takamina	vegetal	4<pH<9	20<T<65
Papaina Takamina	vegetal	6<pH<8	20<T<75

Fonte: GUADIX, et al., 2000.

PEM¹ = Composto proteolítico obtido por uma mistura de enzimas pancreáticas purificadas, incluindo tripsina bovina, tripsina porcina e quimotripsina bovina.

2.5 - PEPTÍDEOS BIOATIVOS

Peptídeos bioativos foram definidos como fragmentos específicos de proteínas que têm um impacto positivo sobre as funções ou condições corporais e podem vir a influenciar a saúde humana (KITTS; WEILER, 2003). Estudos *in vitro* e alguns estudos *in vivo* mostram um largo espectro de funções biológicas atribuídas a peptídeos bioativos, sendo elas: imunomoduladora, antimicrobiana, antioxidante, antitrombótica, hipocolesterolêmica, anti-hipertensiva (KORHONEN; PHILANTO, 2006; RIZZELLO et al., 2016).

Os peptídeos biologicamente ativos podem ser gerados a partir de proteínas precursoras de várias maneiras, incluindo hidrólise enzimática: pelas enzimas digestivas animais ou pelas enzimas derivadas de microrganismos e de plantas, processamento de alimentos: maturação, fermentação, cozimento e armazenamento. Nos países do Sudeste Asiático, como China, Japão e Coreia, a fermentação é amplamente utilizada como a forma mais antiga de preservar alimentos. Acredita-se que a fermentação possa aumentar o valor nutricional de alimentos, possivelmente devido à fragmentação de proteínas a peptídeos bioativos por proteases microbianas (SARMADI et al., 2010; RIZZELLO, et al., 2016).

Um grande número de hidrolisados e peptídeos são obtidos por hidrólise enzimática de matrizes vegetais, alterando as propriedades nutricionais, bioativas e funcionais das proteínas, que incluem digestibilidade melhorada, atividades biológicas, melhoria na solubilidade, emulsificação e características de formação de espuma ou redução de alergenicidade proteica. Por isso o interesse por alimentos funcionais que promovem a saúde, suplementos dietéticos e preparações farmacêuticas contendo peptídeos bioativos vem aumentando acentuadamente (TAVANO, 2013; CODA et al., 2012; IMURA et al., 2015).

2.5.1 – Peptídeos bioativos da soja obtidos por hidrólise ou fermentação

Derivados de alimentos, peptídeos bioativos de proteínas dietéticas geralmente contêm 2-9 aminoácidos. No entanto, este intervalo pode ser alargado para 20 ou mais unidades de aminoácidos (MEJIA; DE LUMEN, 2006). Os peptídeos bioativos podem ser produzidos pela digestão enzimática no intestino ou pelo processamento de alimentos através de fermentação e hidrólise (KITTS; WEILLER, 2003).

Os peptídeos bioativos da soja podem atuar inibindo a enzima conversora da angiotensina I (ECA), mostrando sua atividade anti-hipertensiva. A ECA é uma carboxidipeptil-peptidase não específica associada à regulação da pressão arterial através da modulação do sistema renina-angiotensina e do sistema caliceína-cinina. Esta enzima converte a angiotensina I no potente vasoconstritor angiotensina II, o que leva a um aumento na pressão sanguínea. Portanto, a inibição da ECA irá resultar em um efeito anti-hipertensivo. Em estudos como os de Fernández-Musoles e colaboradores (2013) e Wang e colaboradores (2012) experimentos a longo prazo demonstraram que as atividades de renina e/ou de ECA em plasma, pulmão, rim e aorta, bem como os níveis de angiotensina II, podem ser regulados negativamente por hidrolisados anti-hipertensivos em ratos. Vários peptídeos bioativos inibidores da ECA têm sido encontrados em hidrolisados enzimáticos de proteínas de soja, tais como valina-prolil-prolina (Val-Pro-Pro), isoleucil-prolil-prolina (Ile-Pro-Pro) e tirosina-prolina (Tyr-Pro), que exibiram uma atividade de inibição da ECA e de redução da pressão arterial em ratos espontaneamente hipertensos (NATESH et. al., 2003; WANG; MEJIA, 2005).

A proteína de soja é conhecida também por exercer efeito hipocolesterolêmico, o que levou o Food and Drug Administration (FDA) a aprovar uma alegação de saúde ligando alimentos que são naturalmente ricos em proteína de soja a uma redução em doenças arteriais coronarianas. Na maioria dos estudos realizados em animais e ensaios clínicos, proteínas de soja foram fornecidas aos animais ou seres humanos por via oral. Assim, estas proteínas

foram submetidas à digestão por proteases no trato gastrointestinal, liberando os peptídeos bioativos, que, em seguida, podem diminuir os níveis de colesterol sérico. Os mecanismos considerados responsáveis pela atividade hipocolesterolêmica de alimentos de soja e seus peptídeos bioativos envolvem a estimulação da secreção de ácidos biliares, alterações no metabolismo do colesterol no fígado, além de efeitos hormonais e de regulação dos receptores de colesterol (WANG; MEIJA, 2005; SINGH e HATI, 2014). Com base nestas observações, é provável que os peptídeos de soja possam ser responsáveis, pelo menos em parte, pelos benefícios hipocolesterolêmicos de proteína de soja. Zhong e colaboradores (2007) e Nagaoka e colaboradores (1997) relataram que o hidrolisado de proteína de soja apresentou um forte efeito de diminuição do colesterol, em ratos.

A soja tem sido muito utilizada no tratamento da obesidade (ANDERSON; MOORE, 2004) e acredita-se que as proteínas de soja possam contribuir para diminuir a epidemia de obesidade em humanos, diminuindo a fome, aumentando a taxa metabólica e promovendo perda de peso (ALLISON et al., 2003; FONTAINE et al., 2003; OHR, 2005). No entanto, o efeito de peptídeos anti-obesidade em seres humanos ainda não foi comprovado (WANG; MEIJA, 2005). A Tabela 4 mostra estudos recentes que avaliaram as bioatividades dos peptídeos encontrados na soja.

Tabela 4. Dados da literatura sobre bioatividades de peptídeos da soja.

Forma da proteína	Enzima/ Microorganismo	Bioatividade	Seqüência de aminoácidos	Autores, Ano
Isolado protéico	Pepsina e tripsina	Antihipertensivo (<i>in vitro</i>)	IVF, LLF, LNF, LSW, LEF	Gu, Wu, 2013
Soja Preta	<i>Aspergillus oryzae</i>	Antiobesidade (<i>in vivo</i>)	NLQGENEEEDSGAIVTVK, VSIIDTNSLENQLDQMPR, KEQQQEQQQEEQPLEVR, EQQQEQQQEEQPLEVR, GNPDIEHPETM, LDTSNFNNQLDQTPRVF, NQEQEFLKYQ, RLLLLLGWLLIIVGVILLVGST K, KEQQQEEQQEEQPLEVR, IIDTNSLENQLDQMPR, LDTSNFNNQLDQNPRVF, EQQQRQQQEEQPLE	Kim et al, 2013
Isolados de proteína de soja com	Alcalase	Anticancer (<i>in vitro</i>)		Rayaprolu et al., 2012

alto teor de ácido oleico				
Farelo de soja altamente desnaturado	Neutrase	Antioxidante (<i>in vitro</i>)		Xu et al., 2013
Proteína de soja		Hipocolesterolemico (<i>in vivo</i>)	LPYPR e WGAPSL	Zhang et al., 2013

Hidrolisados de proteínas da soja apresentam ainda diversas vantagens tecnológicas sobre as proteínas nativas tais como: melhor solubilidade, consistência e viscosidade, melhora das propriedades emulsificantes, estabilidade ao aquecimento, maior resistência à precipitação provocada pela alteração do pH e a presença de íons metálicos, além de poderem apresentar peptídeos com atividade biológica (CLEMENTE, 2000; YUST et al., 2010; LAMSAL et al., 2007).

2.5.2 - Peptídeos antioxidantes

A hidrólise com enzimas tem sido amplamente utilizada para a produção de peptídeos a partir de proteínas de alimentos. No momento da hidrólise da proteína, a sua estrutura é alterada gerando peptídeos com possíveis bioatividades. Enzimas comerciais como alcalase, protamex e flavourzyme, produzidas por microrganismos, bem como a papaína (de origem vegetal) e pepsina-tripsina (de origem animal) têm sido utilizadas na produção de peptídeos antioxidantes (TINTORE et. al., 2013, SINGH e HATI, 2014). Os peptídeos antioxidantes podem ser obtidos a partir da digestão de proteínas de origem animal ou vegetal, utilizando enzimas endógenas ou exógenas. A atividade antioxidante de peptídeos bioativos pode ser atribuída à sua capacidade de neutralização de radicais livres, à inibição da peroxidação lipídica e às propriedades de quelação de íons metálicos (SMARANAYAKA & LI-CHAN, 2011; TINTORE et. al., 2013; SINGH e HATI, 2014).

Vários aminoácidos, tais como Tirosina (Tyr), Metionina (Met), Histidina (His), Lisina (Lys) e Triptofano (Trp) são geralmente aceitos como antioxidantes (MEIJA, LUMEN, 2006). Peptídeos antioxidantes contêm de 5-16 resíduos de aminoácidos, com baixa massa molecular, de baixo custo, alta atividade e de fácil absorção (SARMADI, 2010). O aumento de atividade dos peptídeos em comparação com os aminoácidos livres é devido às propriedades físico-químicas únicas conferidas pelas suas sequências de aminoácidos (TINTORE et al., 2013). Tang e colaboradores (2010) estudando a composição dos aminoácidos de peptídeos obtidos de zeína, proteína componente do subproduto obtido a

partir de processamento de amido de milho, identificaram duas sequências responsáveis pela atividade antioxidante: Tyr-Ala e Leu-Met-Cys-His. Suetsuna et al. (2000) isolaram um hexapeptídeo de hidrolisado de caseína, onde a sequência Glu-Leu no peptídeo identificado, Tyr-Phe-Tyr-Pro-Glu-Leu, mostrou-se essencial para a atividade. Mendis et al. (2005) purificaram um peptídeo com a sequência His-Gli-Pro-Leu-Gli-Pro-Leu de hidrolisado de gelatina de pele de peixe e sugeriram que a presença de Histidina (His), Leucina (Leu), Glicinina (Gli) e Prolina (Pro) desempenhou um papel importante na atividade.

Chen e colaboradores (1995) demonstraram que o maior efeito antioxidante da proteína de soja β -conglucina pode ser atribuído a seis peptídeos compostos por 5-16 resíduos de aminoácidos, são eles: Val-Asn-Pro-His-Asp-His-Gln-Asn; Leu-Val-Asn-Pro-His-Asp-His-Gln-Asn; Leu-Leu-Pro-His-His, Leu-Leu-Pro-His-His-Ala-Asp-Ala-Asp-Tyr, Val-Ile-Pro-Ala-Gly-Tyr-Pro e Leu-Gln-Ser-Gly-Asp-Ala-Leu-Arg-Val-Pro-Ser-Gly-Thr-Thr-Tyr-Tyr, onde 4 deles apresentaram histidina na sua sequência, esta atividade pode ser atribuída à capacidade quelante e à capacidade de captura de radical lipídico do anel imidazol. As atividades antioxidantes dos peptídeos contendo histidina foram superiores às da própria histidina. Isto foi parcialmente explicado pelo aumento da hidrofobicidade dos peptídeos, o que levou a uma maior interação entre os peptídeos e ácidos graxos, os mesmos autores, estudaram a atividade antioxidante de peptídeos concebidos com base no peptídeo antioxidante isolado a partir de hidrolisado de proteína de soja (Leu-Leu-Pro-His-His), notando que os aminoácidos His e Pro desempenharam um papel importante no comportamento antioxidante. Sabe-se que os peptídeos que contêm histidina na estrutura podem atuar como quelantes de metais, captadores de radicais hidroxila e espécies reativas de oxigênio (MEJIA; LUMEN, 2006; PIHLANTO, 2008).

2.6 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

O método DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazil) baseia-se na redução de soluções alcoólicas do radical DPPH[•] na presença de um antioxidante doador de elétron ou hidrogênio, formando um composto estável. A capacidade antioxidante é proporcional à diminuição da concentração do radical DPPH[•] nas amostras analisadas. No decorrer da reação, a coloração violeta do meio passa a amarela e a capacidade antioxidante é facilmente avaliada pelo monitoramento do decréscimo da absorbância a 517nm. Quando o DPPH[•] é reduzido por um antioxidante, a absorbância diminui. Trata-se de um radical livre, orgânico nitrogenado, estável, que aceita um elétron ou um radical hidrogênio para se tornar uma molécula estável. O método do DPPH está entre os mais utilizados atualmente para avaliar a atividade

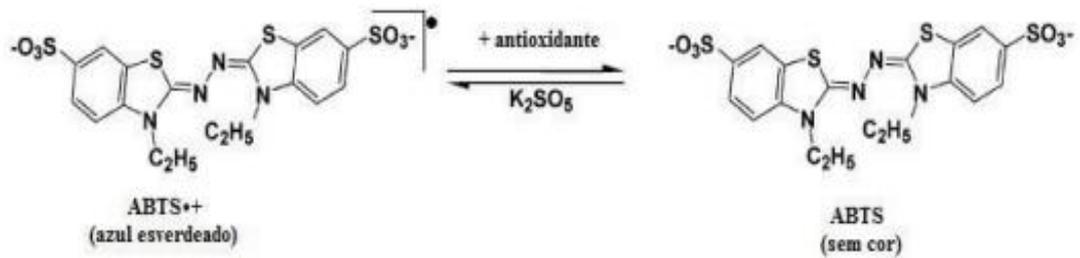


Figura 6. Redução do ABTS por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.

Fonte: SALVADOR, 2011.

O método de FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) visa determinar a redução do ferro em fluidos biológicos e soluções aquosas de compostos puros. O método pode ser aplicado não somente para estudos da atividade antioxidante em extratos de alimentos e bebidas, mas, também, para o estudo da eficiência antioxidante de substâncias puras, com resultados comparáveis àqueles obtidos com outras metodologias mais complexas. A reação mede a redução férrica de 2,4,6- tripiridil -s- triazina (TPTZ) para um produto colorido, detectando compostos com potencial redox $< 0,7\text{V}$ (o potencial redox do Fe^{3+} -TPTZ), como mostrado na Figura 7 (PULIDO, BRAVO, SAURA-CALIXTO, 2000).

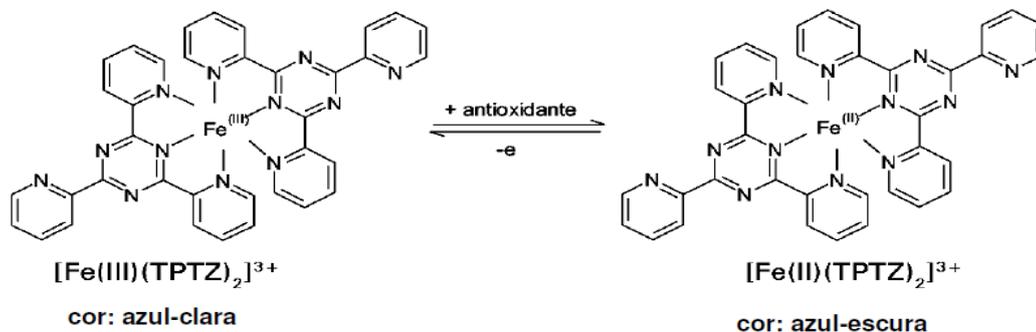


Figura 7. Redução do complexo Fe^{3+} - TPTZ a Fe^{2+} - TPTZ por meio de um antioxidante

Fonte: RUFINO et al., 2006

O método ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) foi originalmente desenvolvido por Cao e colaboradores (1993). Este método, relativamente simples e sensível, mede a capacidade do antioxidante em sequestrar radicais peróxil que são gerados por uma fonte radicalar, AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropano) dihidroclorado) a 37°C . O efeito protetor de uma amostra contendo antioxidante é mensurado pelo cálculo da área sob a curva de decaimento da fluorescência da amostra comparando-se com a de uma amostra “branco”, sem antioxidante presente, tendo a fluoresceína, como alvo mais comum no uso atual, que é

intensamente fluorescente em sua forma nativa. Quando atacada por radicais peroxil, a fluorescência é perdida. Um antioxidante retarda a perda de fluorescência por extinção dos radicais peroxil via transferência de átomos de hidrogênio ou adição de radical. O ensaio ORAC considera tanto o tempo de inibição como o grau de inibição da ação dos radicais livres causada por antioxidantes. Usando-se Trolox em concentrações conhecidas, uma curva padrão é gerada e a atividade ORAC da amostra é calculada. Este ensaio expressa o resultado em unidade de ORAC ou equivalentes de Trolox, o qual corresponde à quantidade de Trolox em μ moles equivalentes por grama de amostra (CAO et al., 1993; OU et al., 2001; PRIOR et al., 2005).

Os métodos FRAP, ABTS, DPPH e ORAC são mais comuns para determinar a capacidade antioxidante *in vitro*. Recomenda-se que pelo menos dois, e de preferência, todos estes ensaios sejam combinados, de modo a proporcionar informação abrangente sobre a capacidade antioxidante de um gênero alimentício, tendo em conta os prós e os contras de cada ensaio, bem como a sua aplicabilidade (PÉREZ-JIMENEZ, 2008).

Com base nas reações químicas envolvidas, os principais ensaios de capacidade antioxidante podem ser divididos grosseiramente em duas categorias: ensaios baseados na reação de transferência de átomos de hidrogênio (TAH) e ensaios baseados na reação de transferência de um único elétron (TE). Os ensaios baseados em TE envolvem uma reação redox com o oxidante como um indicador do ponto final da reação, que são representados pelos ensaios FRAP e ABTS. A maioria dos ensaios baseados em TAH monitora a cinética de reação competitiva e a quantificação é derivada das curvas cinéticas, o que é o caso do ensaio ORAC. Já o método DPPH combina ambas as categorias (PÉREZ-JIMENEZ, 2008; HUANG et al., 2005).

Apesar da diversidade de métodos, não há ainda um método universal pelo qual a atividade antioxidante possa ser medida precisamente e quantitativamente, devido aos diversos tipos de radicais e aos diferentes alvos de oxidação. Para uma avaliação correta desta atividade em alimentos e sistemas biológicos, modelos individuais devem ser desenvolvidos desde que representem as mesmas condições químicas, físicas e ambientais esperadas para o sistema em análise. Segundo Prior, Wu e Schaich (2005) 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 (BOLANHO, 2010; DAVID, 2010).

2.6.2 - Índice de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBAR's)

O teste de TBA (ácido 2-tiobarbitúrico) quantifica o malonaldeído (MDA), um dos principais produtos de decomposição dos hidroperóxidos de ácidos graxos poliinsaturados, formado durante o processo oxidativo, é muito reativo e permanece ligado a outros ingredientes alimentares, se libertando num tratamento com ácido e calor. O MDA é um dialdeído de três carbonos, com grupos carbonilas nos carbonos C-1 e C-3 (Figura 9). A análise do índice de ácido tiobarbitúrico (TBA) é um método espectrofotométrico, que detecta produtos secundários da peroxidação, medindo a absorbância de um complexo rosa formado entre o TBA e MDA. A formação do composto TBA-MDA, na proporção de 2:1, é possivelmente iniciada pelo ataque nucleofílico, envolvendo o carbono 5 do TBA e o carbono 1 do MDA, seguido de desidratação e reação similar subsequente do composto intermediário com uma segunda molécula de TBA, na proporção de 1:1 (OSAWA et al. 2005; GEADA, 2012).

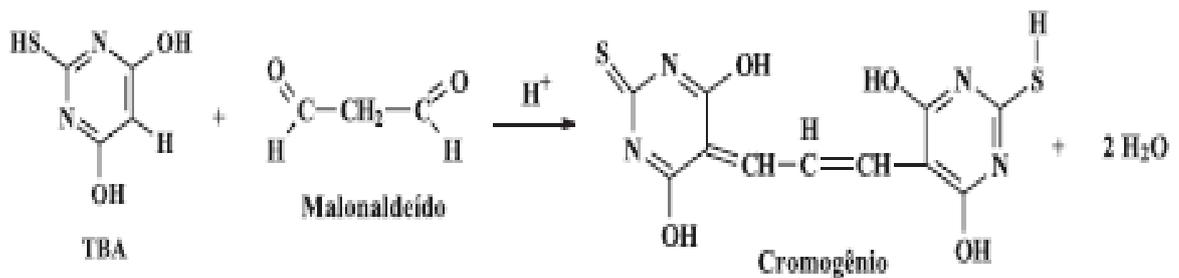


Figura 9. Reação do teste de TBA entre o ácido 2-tiobarbitúrico e o malonaldeído, formando o composto colorido.

Fonte: OSAWA et al., 2005.

Considerando os danos oxidativos e a necessidade de se evitar a formação de radicais livres para a conservação dos alimentos e também para garantir a ingestão de alimentos seguros, pode-se considerar de suma importância a procura de novos antioxidantes naturais para uso em alimentos ajudando a retardar sua degradação e aumentando o tempo de prateleira do produto sem causar efeitos nocivos ao consumidor, que apresenta um interesse crescente por este tipo de alimento e tem incentivado pesquisadores a buscar tecnologias de processamento que atendam a essa demanda por conservantes naturais. A possibilidade de se obter hidrolisados contendo peptídeos antioxidantes de concentrado protéico de soja se tornou uma alternativa que se encaixa adequadamente nesse cenário buscado nos dias de hoje.

3 – OBJETIVOS

- Geral: Obter um hidrolisado proteico de soja com atividade antioxidante visando aplicação como conservante em alimentos.

- Específicos:
 - Desenvolver o processo de hidrólise para obtenção de hidrolisados de concentrado protéico de soja com uso da enzima papaína;

 - Testar e comparar a atividade antioxidante da mistura de peptídeos utilizando os métodos DPPH, ABTS, FRAP e ORAC;

 - Avaliar o potencial de aplicação do hidrolisado em pescado com o intuito de diminuir a oxidação lipídica.

4 – MATERIAL E MÉTODOS

4.1 – MATERIAL

4.1.1 – Material Vegetal

O concentrado protéico de soja foi obtido em supermercado localizado no estado do Rio de Janeiro, contendo em torno de 75% de proteína total, valor este obtido pelo método de Kjeldal no laboratório de Bioquímica Nutricional da UNIRIO.

4.1.2 – Reagentes e enzima

Os reagentes químicos utilizados, como sais, ácidos, bases, alcoóis, foram adquiridos de empresas com reconhecido padrão de qualidade, como Merck® e Sigma®, e em grau analítico. A enzima proteolítica purificada utilizada foi adquirida da Sigma®.

4.1.4 – Peixe

O lote de sardinhas foi adquirido em uma feira livre, localizada no município do Rio de Janeiro, nos meses de Julho e Agosto/2016. Foram mantidas em armazenamento a -18°C até sua utilização.

4.2 – METODOLOGIA

A Figura 10 apresenta um fluxograma que sumariza a metodologia aplicada no presente trabalho e detalhada nos itens a seguir.

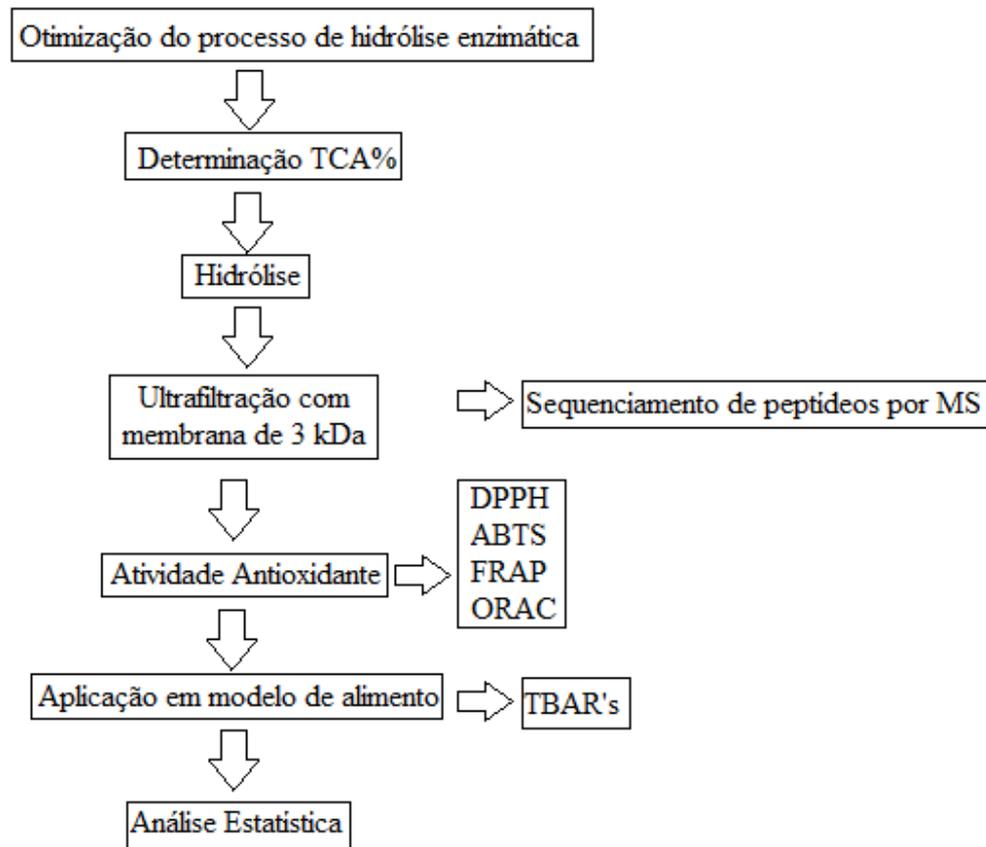


Figura 10. Fluxograma da metodologia utilizada no presente estudo.

4.2.1 - Otimização do rendimento de hidrólise por planejamento multivariável

Um delineamento experimental foi usado para se obter as composições de meio reacional ótimas para o melhor rendimento possível e para investigar a presença de efeitos sinérgicos ou antagonistas, na mistura dos componentes. O objetivo foi determinar a influência de duas variáveis independentes: teor de concentrado protéico de soja e concentração de NaCl. A relação enzima/proteína (E/P) foi fixada como 1:80, de acordo com testes anteriores (SOARES, 2013). Para este efeito, realizou-se um delineamento composto central rotacional (DCCR), com três repetições do ponto central em cinco níveis (RODRIGUES e IEMMA, 2005). A distância axial α foi determinada como 1,4142 para fazer este planejamento. Os valores reais e codificados são apresentados na Tabela 5. Um conjunto de 12 ensaios foi realizado (Tabela 6). Os valores centrais (0) escolhidos para a concepção experimental foram os seguintes: concentração de NaCl de 2,0M e teor de concentrado protéico 1,05%.

Tabela 5 – Variáveis independentes e os valores utilizados no processo de hidrólise

Variáveis Independentes		Níveis				
		$-\alpha$ (-1,4142)	-1	0	+1	$+\alpha$ (+1,4142)
Teor de NaCl (M)	x_1	1,0	1,2	2,0	2,7	3,0
Teor de Concentrado protéico (%)	x_2	0,1	0,4	1,0	1,7	2,0

Tabela 6 – Matriz do planejamento experimental para otimização da hidrólise.

Ensaio	x_1	x_2	Proporção do meio
1	-1	-1	1,2M NaCl + 0,08g IPS + 0,008g enzima
2	-1	1	1,2M NaCl + 0,34g IPS + 0,034g enzima
3	1	-1	2,7M NaCl + 0,08g IPS + 0,008g enzima
4	1	1	2,7M NaCl + 0,34g IPS + 0,034g enzima
5	-1,41421	0	1,0M NaCl + 0,21g IPS + 0,021g enzima
6	+1,41421	0	3,0M NaCl + 0,21g IPS + 0,021g enzima
7	0	-1,41421	2,0M NaCl + 0,02g IPS + 0,002g enzima
8	0	+1,41421	2,0M NaCl + 0,4g IPS + 0,04g enzima
9	0	0	2,0 NaCl + 0,21g IPS + 0,021g enzima
10	0	0	2,0M NaCl + 0,21g IPS + 0,021g enzima
11	0	0	2,0M NaCl + 0,21g IPS + 0,021g enzima
12	0	0	2,0M NaCl + 0,21g IPS + 0,021g enzima

Os resultados do delineamento experimental foram analisados aplicando o software STATISTICA (Versão 7.0 - Statsoft, EUA). O modelo permitiu a avaliação dos efeitos de termos lineares, quadráticos e interativos das variáveis independentes sobre as variáveis dependentes escolhidas (MYERS & MONTGOMERY, 2002).

Como variável dependente (resposta) foi avaliado o rendimento de hidrólise, calculado pela relação percentual entre o teor de proteína solúvel em TCA (0,22M) e o teor de proteína total, conforme descrito no item 4.2.2.

O tempo de hidrólise foi observado ao longo de 4 horas de experimento e expresso também pela relação percentual de TCA, os tempos de reação testados foram 30 minutos, 1, 2, 3 e 4 horas.

4.2.2 - Determinação do teor de proteína solúvel em TCA

O teor de proteína solúvel em TCA (ácido tricloroacético) dos hidrolisados foi determinado utilizando uma versão modificada do método descrito por Pericin et al. (2009). Uma alíquota de 1,0 mL de hidrolisado foi adicionada a um volume igual de 0,44 mol L⁻¹ de ácido tricloroacético (TCA). A mistura foi incubada durante 30 minutos à temperatura ambiente e depois centrifugada (Thermo Fischer Scientific, EUA) a 13000 × g durante 15 min. O sobrenadante foi analisado utilizando o método de Lowry (1951), que utiliza albumina de soro bovino como padrão de proteína para determinar conteúdo protéico. O sobrenadante da mistura do hidrolisado (sem a adição de TCA) também foi analisado por este método. Os resultados foram expressos como percentagem, de acordo com a equação abaixo:

$$\text{TCA\%} = \frac{\text{Proteína Solúvel}}{\text{Proteína Total da amostra}} * 100$$

4.2.3 - Hidrólise utilizando papaína

Foram adicionados 2,7g de concentrado protéico de soja a 100 mL de tampão fosfato pH 7,0 ajustado para a concentração de 2,0M de NaCl. Foram transferidos para um frasco Erlenmeyer de 250 mL e aquecidos a 95°C por 15 minutos, para provocar desnaturação das proteínas e facilitar a ação enzimática. Em seguida, as amostras foram resfriadas em banho de gelo até a temperatura de ensaio e mantidas em banho de aquecimento a 60°C. A papaína, na concentração de 1:80 (enzima:proteína), foi então adicionada, dando início à reação. Para inativação enzimática, após meia hora de reação, o meio reacional foi aquecido a 100°C por 10 minutos e resfriado em banho de gelo. O produto obtido então foi centrifugado (Thermo Fischer Scientific, EUA) a 13000 x g por 15 minutos e o sobrenadante, contendo os peptídeos resultantes da hidrólise, foi aliquotado e congelado para posterior determinação da capacidade antioxidante e liofilizado para teste de peroxidação lipídica em amostras de sardinha (CONTRERAS et al., 2011).

Para fins de comparação, foram realizados ensaios seguindo exatamente a metodologia descrita acima, porém na ausência de NaCl.

4.2.4 – Fracionamento do hidrolisado por ultrafiltração

Após a hidrólise, o hidrolisado proteico foi separado por um processo de ultrafiltração (UF) aplicando dispositivos de centrifuga (Filtros Amicon Ultra-4 com membrana Ultracel-3) (Thermo Fischer Scientific, EUA). Deste modo, obtiveram-se alíquotas do hidrolisado contendo peptídeos de massas moleculares (MM) de < 3 kDa (filtrado) e > 3 kDa (retido). As amostras produzidas foram liofilizadas e armazenadas até utilização.

4.2.5 - Sequenciamento por espectrometria de massas

Os peptídeos foram sequenciados através de espectrometria de massas por nano-ESI-MS / MS (Q-TOF2 Micromass, UK) no Laboratório de Espectrometria de Massa (LBP) da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro. Para este ensaio apenas os peptídeos de baixa massa molecular (< 3kDa) foram sequenciados, devido às mais complexas preparações prévias envolvendo os peptídeos de maior massa molecular.

4.2.6 - Determinação da atividade antioxidante

4.2.6.1 – DPPH

A análise de DPPH foi realizada conforme Brand-Williams (1995), Rufino et al. (2007) modificado. Foram adicionados 2,4 mL de DPPH no tubo de ensaio seguido dos seguintes volumes de amostra 50, 25 e 10 µL, e o volume completado com metanol até se perfazer 3 mL. A leitura foi realizada após 60 minutos e o período de descanso entre leituras se deu em local fechado, sem iluminação. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (SHIMAZDU UV-200, Japão) com absorvância a 515nm. Todos os volumes testados foram avaliados em triplicata. A redução percentual do radical DPPH foi calculada com a seguinte equação:

$$(\% \text{ Redução}) = \frac{(\text{Absorvância do Controle} - \text{Absorvância da Amostra}) \times 100}{\text{Absorvância do Controle}}$$

Onde: Absorvância do Controle = absorvância da solução de DPPH sem antioxidante

Como padrão desse ensaio foi utilizado antioxidante de referência Trolox. Os resultados foram expressos em TEAC (atividade antioxidante equivalente ao Trolox).

4.2.6.2 – ABTS

O teste realizado foi baseado nos autores Rufino et al. (2007), Re et al. (1999) com modificações. Foi preparada uma solução catiônica de ABTS (2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico), misturando 2,5 mL de solução ABTS 7,0mM e 44µL de solução de persulfato de potássio 140mM. Essa mistura reagiu por 16 horas em temperatura ambiente e na ausência de luz. Depois de formado o radical $ABTS^{*+}$, foi adicionado etanol à solução até obter um valor de absorvância de 0,700 ($\pm 0,05$) a 734nm. Em um tubo de ensaio, colocou-se 2,5 mL da solução de ABTS, seguido da amostra nos seguintes volumes, 5, 10 e 15 µL, e seu volume final foi completado com etanol até 3 mL. A determinação da absorvância das amostras foi realizada em temperatura ambiente, 23 °C (± 1), após 6 minutos de reação, em espectrofotômetro (SHIMAZDU UV-200, Japão). Como padrão desse ensaio foi utilizado como antioxidante de referência o Trolox. Os resultados foram expressos em TEAC (atividade antioxidante equivalente ao Trolox).

4.2.6.3 – FRAP

O poder de redução da amostra, pelo método de FRAP, foi avaliado de acordo com metodologia descrita por Sánchez-González et al. (2005), com algumas modificações. O reagente de FRAP foi preparado como segue: 2,5 mL de uma solução 10mM TPTZ em HCl 40mM foram adicionados a 2,5 mL de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ e 25 mL de tampão acetato 0.3 mM pH 3.6. Em um tubo de ensaio, foi colocado 2,7 mL da solução de FRAP, seguido da amostra nos seguintes volumes, 90, 45 e 20 µL, e seu volume final foi completado com etanol até 3 mL. As amostras foram incubadas à 37°C, por 30 minutos e a leitura realizada a 595 nm em espectrofotômetro (SHIMAZDU UV-200, Japão). Como padrão desse ensaio foi utilizado como antioxidante de referência o Trolox. Os resultados foram expressos em TEAC (atividade antioxidante equivalente ao Trolox).

4.2.6.4 – ORAC

Este ensaio avalia a atividade antioxidante através da inibição da oxidação, induzida pelo radical peroxil, por transferência de átomos de hidrogênio, como metodologia de Huang et al (2002), com modificações. Foi pesado 0,01g das amostras liofilizadas e avolumado em um balão volumétrico de 10 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 duplicata. 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 contendo as amostras e o tampão fosfato foram incubados 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 30s 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. Usando-se Trolox de concentrações conhecidas, uma curva padrão foi gerada e a atividade antioxidante do composto foi calculada. Todas as análises foram feitas em duplicata e os valores foram expressos em TEAC (atividade antioxidante equivalente ao Trolox).

4.2.7 – Teste de aplicação em modelo de alimento

4.2.7.1 - Preparo das amostras de sardinha

A preparação dos patês se deu da seguinte maneira: de cada sardinha, com o auxílio de uma faca, retirou-se a cabeça, barbatana caudal e as vísceras e lavou-se em água corrente para retirar o excesso de sangue. Posteriormente, as sardinhas foram divididas em 6 ensaios, com 40 g de sardinha para cada ensaio. Depois de pesadas, as sardinhas foram adicionadas de antioxidante (BHT padrão ou hidrolisado de soja) e homogeneizadas com o auxílio de um multiprocessador, e então armazenadas de acordo com as condições descritas na Tabela 7. As amostras foram armazenadas em embalagens transparentes, e realizadas em triplicatas.

Tabela 7. Distribuição dos ensaios com os patês de sardinha.

Ensaio	Quantidade de antioxidante	Temperatura
Armazenamento em geladeira	0 mg	8°C \pm 2° C
Armazenamento em freezer	0 mg	-12°C \pm 2° C
Sardinha + Retido	40 mg	8°C \pm 2° C
Sardinha + Filtrado	40 mg	8°C \pm 2° C
Sardinha + Hidrolisado total	40 mg	8°C \pm 2° C
Sardinha + BHT	40 mg	8°C \pm 2° C

4.2.7.2 – Índice de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBAR's)

O valor do índice de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi determinado de acordo com o método de Vyncke (1970) com pequenas modificações, nas amostras de patês de sardinha para avaliar a estabilidade oxidativa durante o período de armazenamento. O método consistiu na extração do aldeído malônico a partir de 1g de amostra de sardinha com 25mL de solução a 7,5% de ácido tricloroacético. O extrato foi filtrado e 2 mL foram retirados e adicionados a 2mL de solução de ácido tiobarbitúrico (0,02M). O ácido malônico das amostras reagiu com o ácido tiobarbitúrico pós incubação em banho-maria a 100°C durante 40 minutos, formando um complexo corado rosa, cuja absorbância foi medida num espectrofotômetro (SHIMAZDU UV-200, Japão), a 532nm. A análise de TBAR's foi realizada ao longo de cinco dias de armazenamento com os seguintes pontos: T0, T1, T2, T3 e T4, com intervalo de 24 horas entre cada tempo, sendo o T0 analisado imediatamente após o preparo de cada grupo de amostras. 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 $\mu\text{mol/mL}$, de onde se obteve uma equação da reta (a curva padrão pode ser encontrado no Apêndice 1), que permitiu avaliar a concentração de aldeído malônico presente em cada amostra. Os resultados foram expressos como valor TBA mg malonaldeído / Kg de produto.

4.3 – ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos neste estudo foram expressos pela média \pm desvio padrão de triplicatas. Os resultados do delineamento experimental foram analisados utilizando o software STATISTICA (Versão 7.0 - Statsoft, EUA). Os demais dados foram analisados pelo Software Graphpad Prism (Versão 5.0 - San Diego, CA, USA) usando a análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey. O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 – OTIMIZAÇÃO DO RENDIMENTO DE HIDRÓLISE POR PLANEJAMENTO MULTIVARIÁVEL

Em um trabalho prévio identificou-se a possível atividade antioxidante de peptídeos da soja (FARIAS, 2014), porém sabe-se que o rendimento de peptídeos em geral é muito baixo (SANTOS et al., 2009; LUO et al., 2014; SCHMIDT et al., 2009), por esse motivo se iniciou um estudo multifatorial a fim de tentar aumentar o rendimento, levando em consideração o teor inicial de proteína.

A concentração de enzima e o tempo de reação não foram avaliados no planejamento inicial, pois em experimento anterior observou-se que havia diferença estatística ($p < 0,05$) entre a concentração máxima e a mínima de enzimas utilizadas (1:10 e 1:80 E/P, respectivamente), tendo a concentração mínima um maior rendimento de hidrólise, como mostrado na Figura 11, portanto a relação mínima entre enzima/proteína (1:80) foi aplicada.

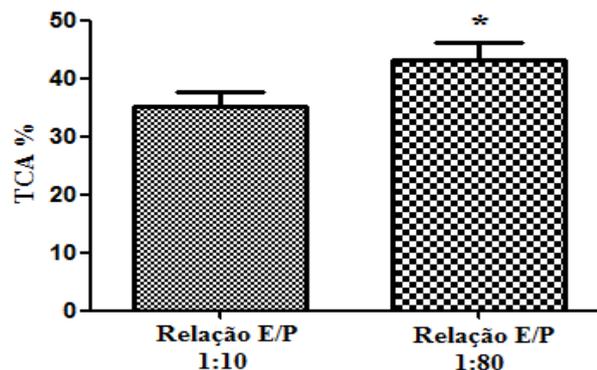


Figura 11. Relação enzima/proteína utilizada na escolha da concentração de enzima. As amostras apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$). Resultado de rendimento expresso em porcentagem de TCA.

O tempo de reação é um dos fatores que mais influenciam a atividade enzimática, sendo feito então um experimento separado, mostrando o comportamento cinético de hidrólise, cujos resultados serão apresentados a seguir.

Um fator importante para o rendimento da hidrólise é a solubilidade das proteínas a serem hidrolisadas. Ghribi e colaboradores (2015) indicam que a separação das ligações peptídicas resulta numa redução progressiva da fração de proteína insolúvel e num maior rendimento de proteína solúvel. Sabendo que as proteínas da soja, principalmente as frações

7S (β -conglucina) e 11S (glicina) (OLIVEIRA, 2010), constituem a maior parte da proteína total e são proteínas de armazenamento, classificadas como globulinas, cuja solubilidade depende da presença de sais, resolveu-se iniciar uma otimização onde fosse incluído o teor de sal na amostra. A solubilidade das proteínas, em geral, diminui em concentrações abaixo de 0,1M de sal e aumenta acima dessa concentração. Essa diminuição inicial da solubilidade é devida à diminuição da repulsão eletrostática e da interação hidrofóbica aumentada entre moléculas de proteína, como resultado da blindagem eletrostática de grupos de carga em proteínas por íons (LIU, 1997).

Fatores intrínsecos, incluindo propriedades hidrofóbicas, hidrofílicas, tamanho, carga, e fatores extrínsecos tais como pH, carga iônica e presença de vários sais, e interação com outros componentes alimentares afetam a solubilidade de proteínas. As proteínas de soja são menos solúveis no seu ponto isoelétrico (pH 4,2 a 4,6) e a solubilidade aumenta acentuadamente acima e abaixo deste intervalo de pH, tendo sua solubilidade ótima próximo ao pH 7,0 (LIU, 1997; SORGENTINI et al., 2002; NISHINARI et al., 2014).

A Tabela 8 mostra os resultados calculados como rendimento final dos ensaios realizados, que variou entre 32 e 56,8 TCA%. Com média dos valores de 35,69; desvio padrão de 1,78 e coeficiente de variação de 5.

Tabela 8 - Resultados em rendimento do delineamento composto central rotacional

Ensaio	x_1	x_2	Rendimento (%)
1	-1	-1	34,01918
2	-1	1	56,88582
3	1	-1	32,00601
4	1	1	52,33731
5	-1,41421	0	48,21143
6	1,41421	0	41,6277
7	0	-1,41421	0
8	0	1,41421	52,48894
9	0	0	36,93121
10	0	0	36,51791
11	0	0	33,65027
12	0	0	36,62388

As Tabelas 9, 10 e 11 mostram os valores para as variáveis codificadas sem a eliminação dos valores não significativos. As Figuras 12 e 13 mostram o gráfico de Pareto e a correlação entre os valores experimentais e os valores preditos pelo modelo sem eliminar os valores não significativos, respectivamente.

Tabela 9 – Coeficientes de regressão para a resposta Y_1 considerando as variáveis codificadas sem eliminar os valores não significativos.

	Coeficientes de regressão	Erro Padrão	t (3)	p-valor	Lim. Conf. (-95%)	Lim. Conf. (+95%)
Rendimento	35,69980	1,031686	34,60335	0,000834	31,26081	40,13878
(1) Conc. NaCl(L)	-1,98406	0,631776	-3,14045	0,088188	-4,70237	0,73425
Conc. NaCl (Q)	6,66740	0,751964	8,86664	0,012482	3,43196	9,90284
(2)Conc. isolado(L)	14,67856	0,631776	23,23380	0,001847	11,96025	17,39688
Conc. Isolado (Q)	-2,67015	0,751964	-3,55090	0,070970	-5,90559	0,56529
1L by 2L	-0,63384	0,893466	-0,70941	0,551621	-4,47811	3,21044

% variação explicada (R^2) = 0,89051

$$y_1 = 35,69980 - 1,98406 * \text{Conc. NaCl} + 6,66740 * (\text{Conc. NaCl})^2 + 14,67856 * \text{Conc. I} - 2,67015 * (\text{Conc. I})^2 - 0,63384 * X_1 X_2$$

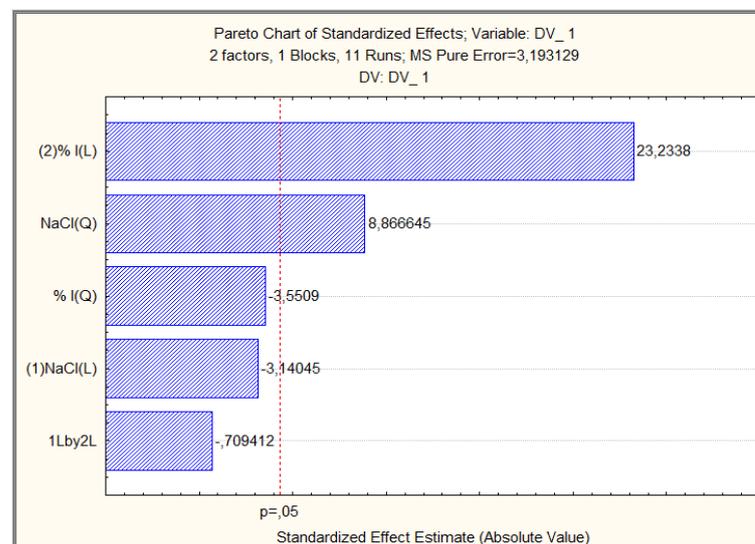


Figura 12 – Gráfico de Pareto considerando as variáveis codificadas sem eliminar os valores não significativos.

Tabela 10 – Análise de variância para a resposta Y_1 considerando as variáveis codificadas sem eliminar os valores não significativos.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Fcal
Regressão	2140,4	5,0	428,1	8,1
Resíduos	263,2	5,0	52,6	
Falta de ajuste	256,791	3		
Erro puro	6,386	2		
Total	2403,578	10		

% variação explicada (R^2) = 0,89051

Tabela 11 – Dados preditos pelo modelo considerando as variáveis codificadas sem eliminar os valores não significativos.

	Y exp. Rendimento (%)	Y predito	Desvio Absoluto	Desvio Relativo
1	34,01918	26,36871	7,65047	22,4887
2	56,88582	56,99351	-0,10769	-0,18931
3	32,00601	23,66826	8,33775	26,05058
4	52,33731	51,75771	0,57959	1,107413
5	48,21143	51,84048	-3,62905	-7,52736
6	41,62770	46,22871	-4,60101	-11,0528
7	0,00000	9,60088	-9,60088	0
8	52,48894	51,11813	1,37082	2,611636
9	36,93121	35,69980	1,23141	3,334334
10	36,51791	35,69980	0,81812	2,240325
11	33,65027	35,69980	-2,04953	-6,09068

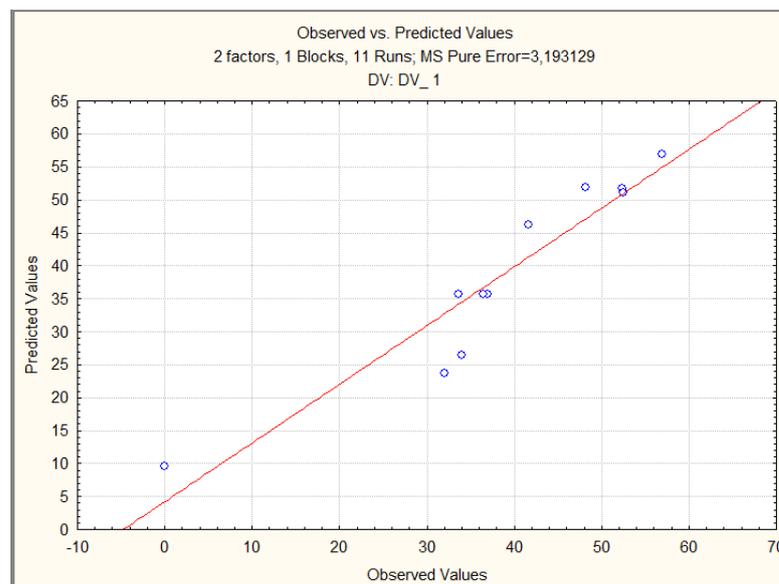


Figura 13 - Gráfico da correlação entre os valores experimentais e os valores preditos pelo modelo sem eliminar os valores não significativos.

As Tabelas 12, 13 e 14 mostram os valores para as variáveis codificadas eliminando os valores não significativos. As Figuras 14 e 15 mostram o gráfico de Pareto e a correlação entre os valores experimentais e os valores preditos pelo modelo eliminando os valores não significativos, respectivamente.

Tabela 12 – Coeficientes de regressão para a resposta Y_1 considerando as variáveis codificadas.

	Coeficientes de regressão	Erro Padrão	t (3)	p-valor	Lim. Conf. (-95%)	Lim. Conf. (+95%)
Rendimento	33,18672	0,750662	44,20994	0,000511	29,95688	36,41656
Conc. NaCl (Q)	7,45274	0,718704	10,36969	0,009172	4,36040	10,54507
(2) Conc. Isolado (L)	14,67856	0,631776	23,23380	0,001847	11,96025	17,39688

% variação explicada (R^2) = 0,85998

$$y_1 = 33,18672 + 7,45274 * (\text{Conc. NaCl})^2 + 14,67856 * \text{Conc. I.}$$

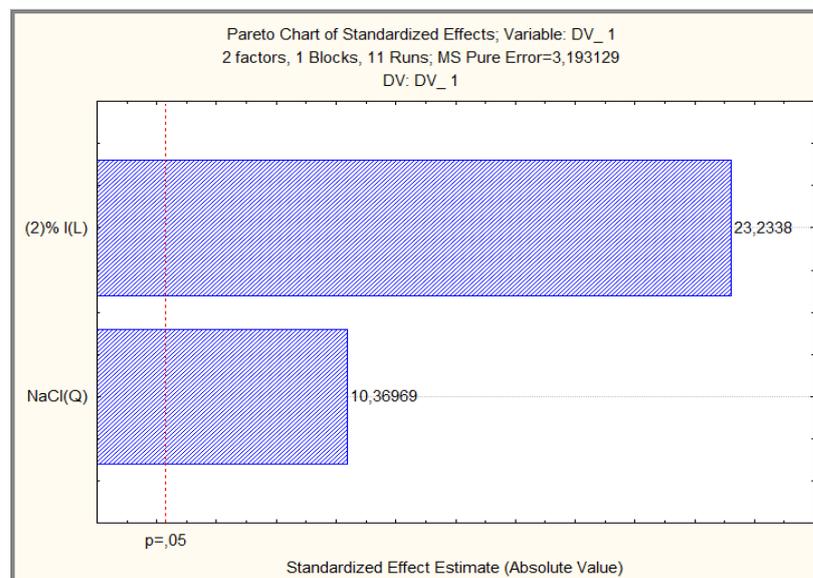


Figura 14 – Gráfico de Pareto considerando as variáveis codificadas eliminando os valores não significativos.

Tabela 13 – Análise de variância para a resposta Y_1 considerando as variáveis codificadas eliminando os valores não significativos.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Fcal	F tab
Regressão	2067,0	2,0	1033,5	24,6	5% = 3,88
Resíduos	336,5	8,0	42,1		
Falta de ajuste	330,151	6			1% = 6,92
Erro puro	6,386	2			
Total	2403,578	10			

% variação explicada (R^2) = 0,85998

Tabela 14 – Dados preditos pelo modelo considerando as variáveis codificadas eliminando os valores não significativos.

	Y exp. Rendimento (%)	Y predito	Desvio Absoluto	Desvio Relativo
1	34,01918	25,96089	8,0583	23,68752
2	56,88582	55,31802	1,5678	2,756047
3	32,00601	25,96089	6,0451	18,88739
4	52,33731	55,31802	-2,9807	-5,69517
5	48,21143	48,09219	0,1192	0,247244
6	41,62770	48,09219	-6,4645	-15,5293
7	0,00000	12,42809	-12,4281	0
8	52,48894	53,94534	-1,4564	-2,77468
9	36,93121	33,18672	3,7445	10,13912
10	36,51791	33,18672	3,3312	9,122099
11	33,65027	33,18672	0,4636	1,377701

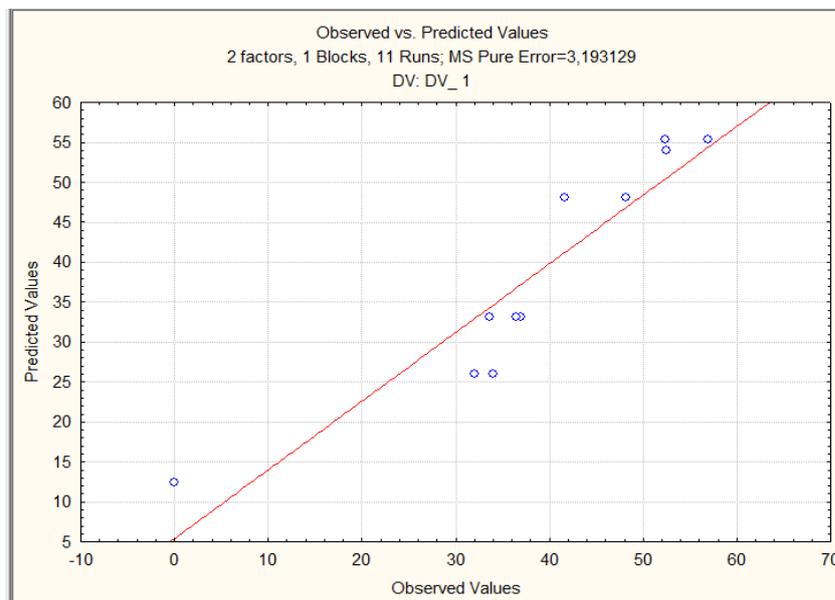


Figura 15 - Gráfico da correlação entre os valores experimentais e os valores preditos pelo modelo eliminando os valores não significativos.

As Tabelas 15, 16 e 17 mostram os valores para as variáveis com valores reais não codificados. As Figuras 16 e 17 mostram o gráfico de Pareto e a correlação entre os valores experimentais e os valores preditos pelo modelo com os valores reais, respectivamente.

Tabela 15 - Coeficientes de Regressão com valores reais para as variáveis independentes.

	Coeficientes de regressão	Erro Padrão	t (3)	p-valor	Lim. Conf. (-95%)	Lim. Conf. (+95%)
Rendimento	59,8949	7,068934	8,47297	0,013645	29,4797	90,3100
(1) Conc. NaCl (L)	-53,7617	6,112173	-8,79584	0,012680	-80,0603	-27,4631
Conc. NaCl (Q)	13,1039	1,457141	8,99286	0,012141	6,8343	19,3734
(2) Conc. Isolado (L)	38,0753	5,138891	7,40925	0,017733	15,9645	60,1862
Conc. Isolado (Q)	-6,7654	1,677622	-4,03276	0,056342	-13,9837	0,4528
1L by 2L	-0,7929	1,830652	-0,43311	0,707172	-8,6695	7,0838

% variação explicada (R²) = 0,9085

$$y_1 = 59,8949 - 53,7617 * \text{Conc. NaCl} + 13,1039 * (\text{Conc. NaCl})^2 + 38,0753 * \text{Conc. I} - 6,7654 * (\text{Conc. I})^2 - 0,7929 * X_1 X_2$$

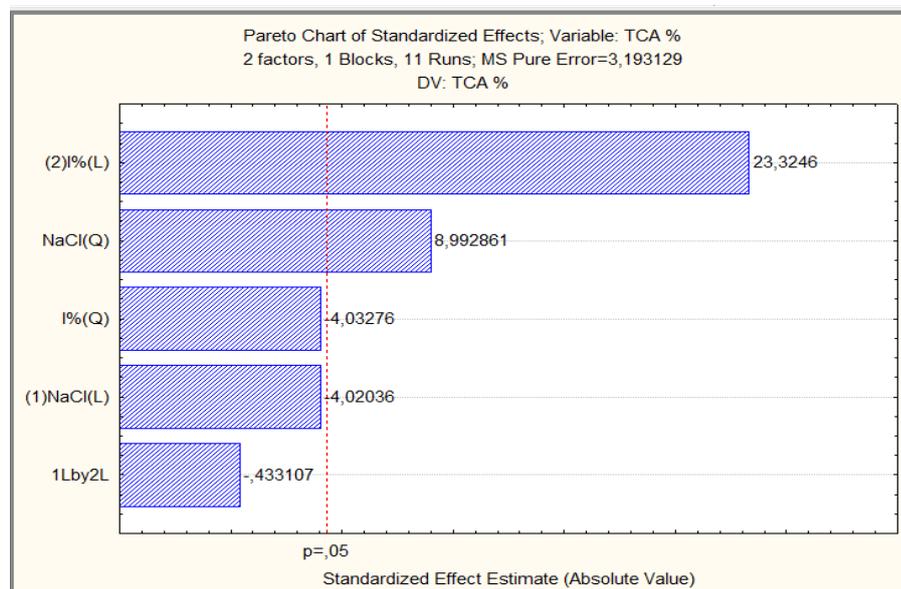


Figura 16 - Gráfico de Pareto considerando as variáveis codificadas considerando os valores reais.

Tabela 16 – Análise de variância para a resposta Y₁ considerando as variáveis reais.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Fcal	F tab
Regressão	2183,7	5,0	436,7	9,9	
Resíduos	219,9	5,0	44,0		
Falta de ajuste	213,531	3			
Erro puro	6,386	2			
Total	2403,578	10			

% variação explicada (R²) = 0,9085

Tabela 17 – Dados preditos pelo modelo considerando as variáveis decodificadas.

	Y exp. Rendimento (%)	Y predito	Desvio Absoluto	Desvio Relativo
1	34,01918	28,01747	6,00172	17,64217
2	56,88582	57,80886	-0,92304	-1,62262
3	32,00601	23,55677	8,44924	26,39892
4	52,33731	51,80207	0,53523	1,022655
5	48,21143	50,92471	-2,71328	-5,62788
6	41,6277	46,56716	-4,93946	-11,8658
7	0	8,36821	-8,36821	0
8	52,48894	50,70431	1,78463	3,400012
9	36,93121	35,64207	1,28914	3,490652
10	36,51791	35,64207	0,87584	2,398385
11	33,65027	35,64207	-1,99180	-5,91912

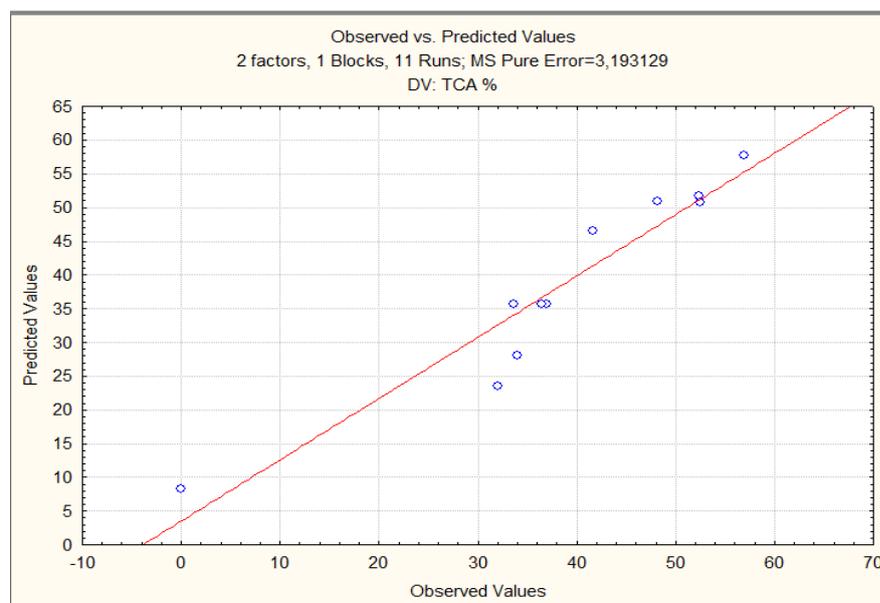


Figura 17 - Gráfico da correlação entre os valores experimentais e os valores preditos pelo modelo utilizando os valores reais.

Através das superfícies de respostas mostradas na Figura 18 (A, B) pode-se observar que, quando há um aumento na quantidade de substrato, o rendimento melhora, chegando a um máximo de 40%, quando a concentração média de NaCl (2,0M) é aplicada.

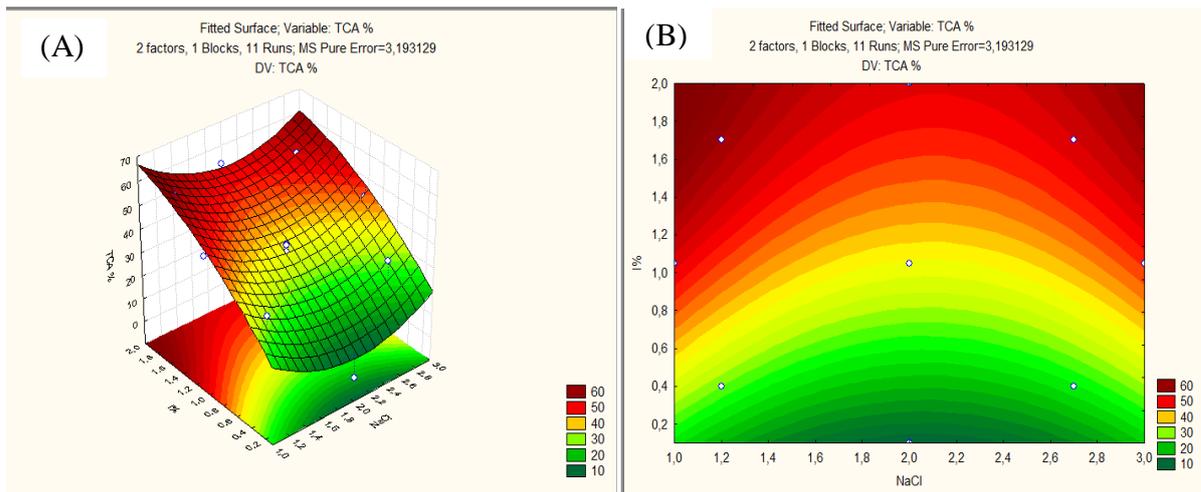


Figura 18. Superfície de resposta (A) e curvas de contorno (B) do efeito combinado da concentração de substrato (% CPS) e NaCl no rendimento de hidrólise (TCA%).

Com base nos dados e na equação gerada para variáveis codificadas eliminando dos valores não significativos (1), os valores otimizados foram 2,0M de NaCl e 2,7% de concentrado protéico de soja (CPS). O modelo polinomial mostra que o termo linear de concentração do substrato contribui para a resposta, assim como a concentração de NaCl quadrática.

$$y_1 = 33,18672 + 7,45274 * (\text{Conc. NaCl})^2 + 14,67856 * \text{Conc. CPS}. \quad (1)$$

Os valores otimizados foram substituídos na equação e como resultado obteve-se o valor de 53,9889 % TCA. Foram então realizados testes experimentais com os valores otimizados. Os valores encontrados foram analisados pelo teste t e comparados com o resultado da equação, onde não houve diferença estatística entre os dados experimentais e o resultado obtido na equação, com 95% de confiança, indicando que o valor predito pela equação foi confirmado pelos dados experimentais, onde o t calculado foi de 2,364 e o t tabelado (0,05 bicaudal ou bilateral) foi de 2,447. Como t calculado foi menor que t tabelado, não há diferença estatística entre os valores obtidos.

Wang e colaboradores (2014) realizaram um experimento similar, onde otimizaram a hidrólise de proteínas de ostras com a enzima subtilisina e encontraram valores de TCA% entre 50,9 e 84,8 %, com uma taxa de 2,4 e 1,8 % de relação enzima/substrato, respectivamente, esses resultados concordam com o encontrado no presente trabalho, em que a menor relação enzima/substrato apresentou maior rendimento em TCA %. Santos e colaboradores (2009), fazendo a otimização da hidrólise de proteína de peixe com duas enzimas, conseguiram valores de TCA% entre 34,7 e 18,6 % para a enzima alcalase e para a

enzima flavourzyme entre 14,3 e 30 %, onde as variáveis que obtiveram maior efeito no processo de hidrólise com alcalase foram temperatura, pH e concentração do substrato, enquanto que para flavourzyme foram pH, concentração da enzima e concentração do substrato. Em estudo de Luo e colaboradores (2014) com caseinato de sódio hidrolisado por três enzimas, a papaína foi a que gerou maior grau de hidrólise comparada à pancreatina e tripsina, com valor de hidrólise de 17,11 % em 30 minutos de hidrólise, o que os autores atribuem à menor especificidade da enzima em relação às outras testadas.

Os aminoácidos livres não são geralmente eficazes como antioxidantes em sistemas alimentares e biológicos, e a proteólise extensiva de proteínas alimentares, de fato, foi relatada como tendo resultado uma diminuição da atividade antioxidante (SAMARANAYAKA E LI-CHAN, 2011). Souissi et al. (2007) relataram que os hidrolisados com alto grau de hidrólise contêm altos níveis de aminoácidos hidrofílicos.

Em relação ao tempo de hidrólise desse estudo, foi realizado um ensaio cinético para avaliar a influência do tempo sobre o rendimento de hidrólise. Foi realizado um estudo ao longo de 240 minutos de experimento, como mostrado na Figura 19. Não houve diferença entre os pontos a partir de 30 minutos, sendo esse o tempo padrão estabelecido para as hidrólises posteriores. Resultado semelhante se observou em estudo de Xia e colaboradores (2012), onde analisando hidrolisados de glutelina de cevada com alcalase e flavourzyme, observou-se um significativo aumento nos primeiros 30 minutos de hidrólise seguido por uma taxa bem mais lenta de aumento até 4 horas de hidrólise, com grau de hidrólise de 12% e 14%, para alcalase e flavourzyme, respectivamente, em 30 minutos.

Em estudo de Yang e colaboradores (2014) observou-se que o grau de hidrólise de peptídeos de soja aumentou conforme o tempo de reação aumentou, onde a variação de tempo foi entre 30 minutos e 3 horas, diferentemente do presente estudo.

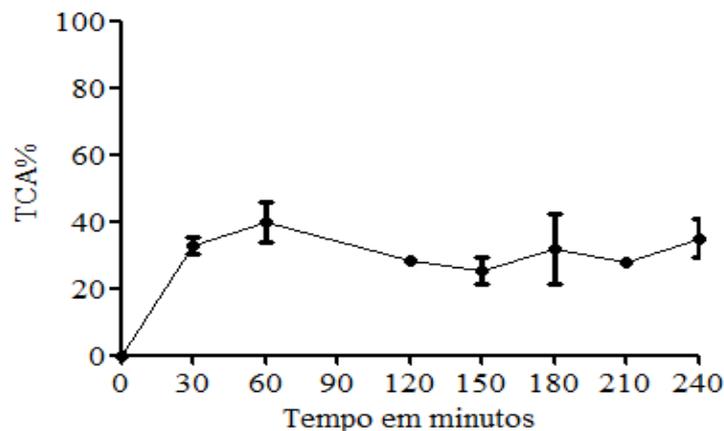


Figura 19. Rendimento de hidrólise ao longo de 240 minutos, expressos em porcentagem de TCA.

5.2 - DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNA E RENDIMENTO DA HIDRÓLISE

Com as condições de hidrólise ajustadas, o rendimento foi expresso em porcentagem com relação à massa da amostra liofilizada. O mesmo procedimento foi realizado, porém sem a presença de NaCl para comparação nas análises posteriores. A Tabela 18 mostra os rendimentos das amostras, indicando menores rendimentos na presença de NaCl do que na ausência. É possível que tenha havido uma diminuição na solubilidade das proteínas na presença de sal, ao contrário do esperado, resultando nos dados de rendimento obtidos. Não há relatos na literatura, nem em experimentos em nosso laboratório, de qualquer influência negativa da presença de NaCl na atividade da enzima testada.

Tabela 18. Rendimento da hidrólise nas condições otimizadas, expressos em % de massa.

	Amostras com NaCl	Amostras sem NaCl
Retido > 3 kDa	26,6%	47,33%
Filtrado < 3 kDa	36,21%	46,62%
Hidrolisado	48,66%	64,56%

5.3 - SEQUENCIAMENTO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Como resultado do sequenciamento dos peptídeos obtivemos as sequências mais abundantes presentes nas amostras com peso molecular < 3kDa, apresentadas na Tabela 19 abaixo, onde a amostra na presença de sal apresentou um maior número de peptídeos encontrados e um maior nível de confiança.

Tabela 19. Sequências de peptídeos encontradas nas amostras < 3 kDa.

Sequencia de peptídeos encontrada		Nível de confiança
ALVVLVLDQWANLELVGLKEQQR	Ausência de NaCl	> 75%
ETQNLEEKET ACFAPGTLFQ AENMQPYVGP EDENNPFLYLR ASQDLENLLK FPGANELDKAELK	Presença de NaCl	> 80%

Sem NaCl - Ala-Leu-Val-Val-Leu-Val-Leu-Asp-Gln-Trp-Ala-Asn-Leu-Glu-Leu-Val-Gli-Leu-Lis-Glu-Gln-Gln-Arg;

Com NaCl - Glu-Tir-Gln-Asn-Leu-Glu-Glu-Lis-Glu-Tir; Ala-Cis-Fen-Ala-Pro-Gli-Tir-Leu-Fen-Gln; Ala-Glu-Asn-Met-Gln-Pro-Tir-Val-Gli-Pro; Glu-Asp-Glu-Asn-Asn-Pro-Fen-Tir-Leu-Arg; Ala-Ser-Gln-Asp-Leu-Glu-Asn-Leu-Leu-Lis; Fen-Pro-Gli-Ala-Asn-Glu-Leu-Asp-Lis-Ala-Glu-Leu-Lis.

Pode-se observar que na presença de NaCl foram identificados 6 peptídeos, e sabendo que os possíveis aminoácidos responsáveis pela atividade antioxidante são principalmente Histidina (His), Leucina (Leu), Glicinina (Gli) e Prolina (Pro) (Mendis et al.,2005), podemos correlacionar a atividade antioxidante encontrada nos métodos ABTS e ORAC a estes peptídeos < 3kDa, pois cada seqüência apresenta pelo menos um dos aminoácidos responsáveis pela atividade.

Seria esperado que a fração com menor massa molecular tivesse maior atividade, porém a fração de maior massa foi a que apresentou maior resultado. Com relação às amostras sem a presença de sal apenas um peptídeo com 23 aminoácidos foi detectado pela espectrometria de massas, e este apresentou em sua composição os aminoácidos Leucina e Glicinina. A baixa atividade desse peptídeo pode ser atribuída a falta da seqüência de aminoácidos Pro-His que, em hidrolisados de soja reportados na literatura, formaram a fração que desempenhou o principal papel na atividade antioxidante (MEIJA, LUMEN, 2006; PIHLANTO, 2008).

Os peptídeos encontrados foram confrontados com as seguintes bases de dados de peptídeos bioativos: BioPep, PeptideDB e EROP- Moscow, e observou-se que não exibem qualquer homologia significativa com os outros peptídeos bioativos que estão listados nos bancos. Este resultado pode indicar que esses peptídeos ainda não foram descobertos ou inseridos nos bancos de dados.

5.4 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

O processo de hidrólise enzimática tem se destacado na melhoria das propriedades funcionais das proteínas, como solubilidade, poder emulsificante e textura, tendo grande aplicabilidade em vários produtos alimentícios, na suplementação dietética de idosos, esportistas e em dietas para controle de peso. A hidrólise enzimática de proteínas é o principal processo para gerar peptídeos bioativos com capacidade antioxidante (BARBOSA et al., 2002; STRÖHER, 2010). Portanto, os peptídeos gerados podem ter atividade antioxidante maior do que a proteína intacta (MEIJA, LUMEN, 2006). Em estudo de Matoba (2002), após a digestão enzimática, por pepsina e pancreatina, de β -conglícinina e glicinina, proteínas da soja, a atividade antioxidante foi aumentada 3-5 vezes, quando avaliada pelo método DPPH. A atividade antioxidante mais elevada de peptídeos em comparação com os aminoácidos livres é atribuída às propriedades físicas conferidas pelas suas seqüências de aminoácidos

únicas, especialmente a estabilidade dos radicais peptídicos resultantes, que não iniciam ou não continuam a propagar reações oxidativas (SAMARANAYAKA & LI-CHAN, 2011).

Alguns fatores que podem afetar a atividade antioxidante dos hidrolisados de proteínas alimentares incluem especificidade das proteases utilizadas para hidrólise, grau de hidrólise e as propriedades estruturais dos peptídeos resultantes, incluindo tamanho molecular, hidrofobicidade e composição de aminoácidos (PIHLANTO, 2006).

Como pode-se observar nas Figuras 20, 21, 22 e 23 a seguir, as metodologias de detecção de atividade antioxidante apresentaram resultados semelhantes, apesar do princípio dos métodos ser diferente, como por exemplo, a atividade da amostra não hidrolisada na presença de NaCl ser maior, possivelmente devido ao fato de o NaCl funcionar como agente pró-oxidante e a proteína íntegra (não hidrolisada) ter a capacidade de quelar esse sal, impedindo que a ação pró-oxidante mascare sua atividade antioxidante nos métodos, o que pode ter acontecido nas outras amostras.

Outra similaridade entre as metodologias foi o comportamento da amostra contendo peptídeos com massa > 3kDa, que apresentou atividade significativamente maior na ausência de sal, exceto na análise de DPPH onde não houve diferença entre os peptídeos < 3kDa e os > 3kDa. Inicialmente, em teoria, era esperado que os peptídeos < 3kDa, com menor massa molecular, apresentassem uma maior atividade antioxidante, como mostrado em diversos trabalhos na literatura (JI et al., 2014; JANG et al., 2016). Porém, em estudo de Xia e colaboradores (2012), peptídeos de glutelina de cevada com massa molecular > 10 kDa também apresentaram maior atividade antioxidante no método DPPH, e os autores levantaram a hipótese de que os aglomerados hidrofóbicos específicos de glutelina, com cadeias laterais volumosas e aromáticas, poderiam estar atuando como doadores de hidrogênio e como sequestradores diretos de radicais. Da mesma forma, em estudo de Wattanasiritham e colaboradores (2016), foi avaliada a atividade antioxidante de hidrolisados de proteína de farelo de arroz com duas enzimas diferentes (papaína e tripsina) pelo método ORAC, onde o hidrolisado com tripsina apresentou atividades melhores, tendo a papaína, atividade de 0,803-2,467 mol de TE/g de proteína, mas não significativamente diferente das amostras não hidrolisadas (0,433-2,307 mol de TE/g de proteína) ($p > 0,05$), exceto para uma de seis amostras. Uma vez que a tripsina apresenta uma especificidade maior do que a papaína, é razoável esperar que os peptídeos gerados pela hidrólise da primeira enzima apresentassem maior massa que aqueles obtidos por hidrólise com papaína.

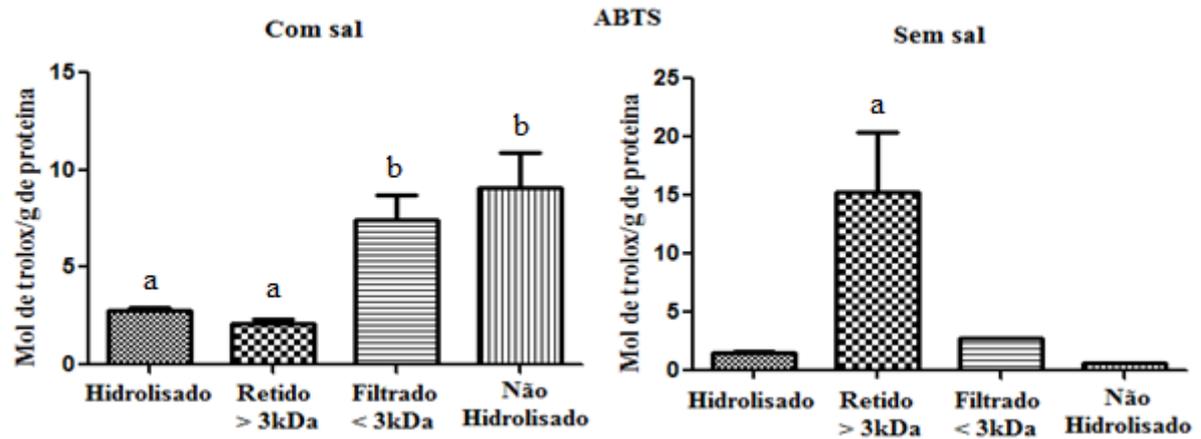


Figura 20. Atividade antioxidante pelo método de ABTS nas amostras de hidrolisado de CPS com e sem NaCl. Médias seguidas por letras distintas (a, b) diferem pelo teste Tukey ($P < 0,05$).

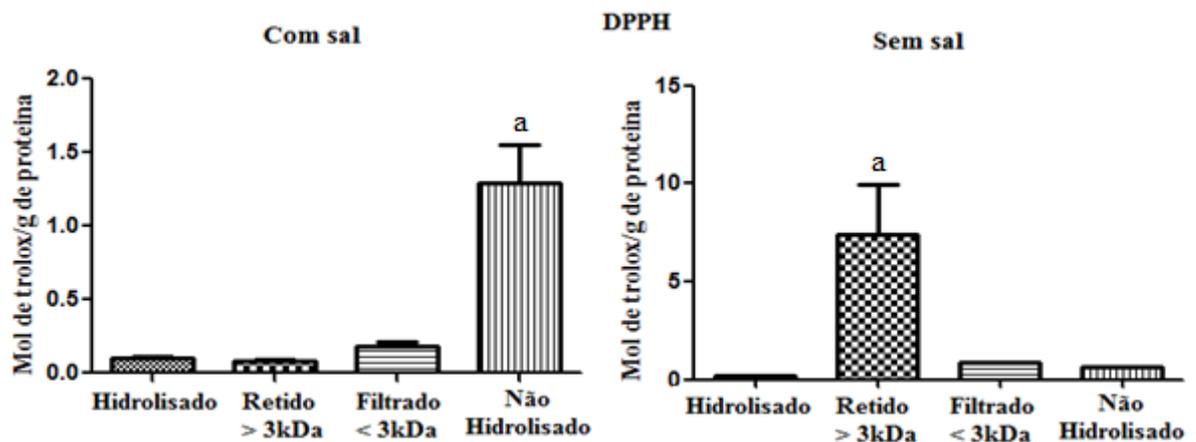


Figura 21. Atividade antioxidante pelo método de DPPH nas amostras de hidrolisado de CPS com e sem NaCl. Médias seguidas por letras diferem pelo teste Tukey ($P < 0,05$).

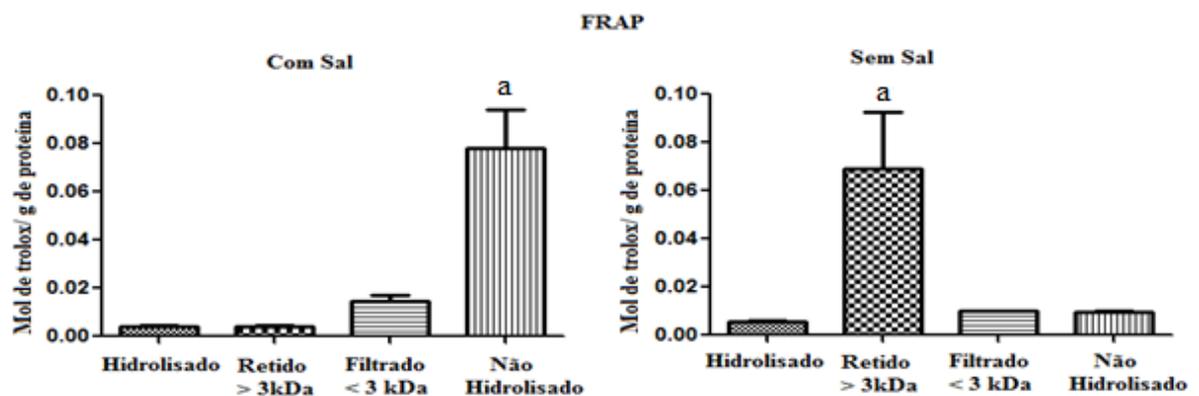


Figura 22. Atividade antioxidante pelo método de FRAP nas amostras de hidrolisado de CPS com e sem NaCl. Médias seguidas por letras diferem pelo teste Tukey ($P < 0,05$).

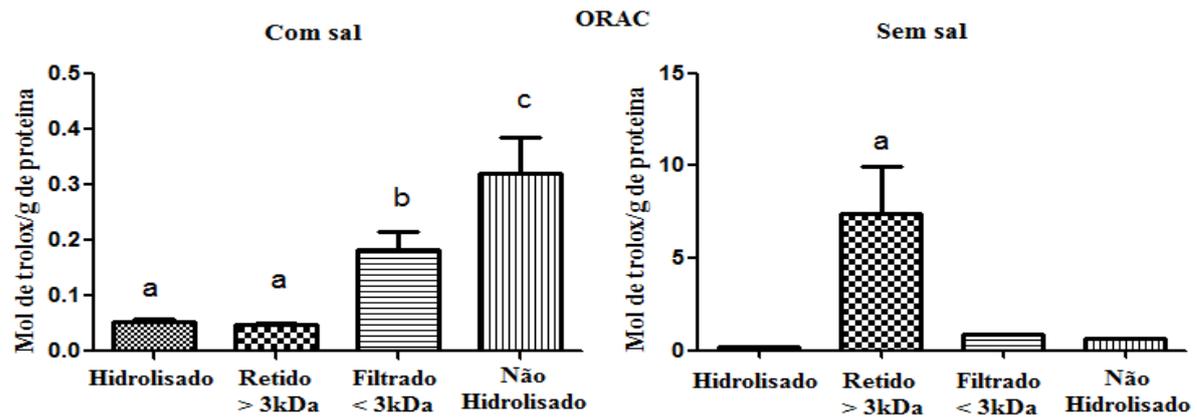


Figura 23. Atividade antioxidante pelo método de ORAC nas amostras de hidrolisado de CPS com e sem NaCl. Médias seguidas por letras distintas (a, b) diferem pelo teste Tukey ($P < 0,05$).

De uma forma geral as amostras se comportaram da mesma forma em todas as análises, com um método confirmando o outro. O método ABTS, foi o único onde, nas amostras com sal, os peptídeos com baixa massa molecular apresentaram atividade elevada, não apresentando diferença estatística quando comparada com a de maior valor (não hidrolisada) (SUCUPIRA et al., 2012).

Em relação ao método DPPH, o estudo de Jang e colaboradores (2016) mostrou que a atividade de eliminação do radical DPPH do peptídeo de hidrolisado de peixe com alcalase na presença de NaCl foi significativamente diminuída em comparação com a do controle (NaCl a 0%) num experimento entre 0 a 6% de NaCl. Segundo os autores os resultados indicaram que não há correlação preditiva entre a estabilidade protéica e a concentração de NaCl, pois a estabilidade do peptídeo é mantida na presença de NaCl em concentrações que variam de 0 a 6%.

Já para o ensaio sem sal, peptídeos maiores e menores apresentaram atividade. A enzima papaína apresenta menor especificidade clivando as proteínas em peptídeos pequenos e, segundo estudo de Tang et al. (2010), sobre a atividade antioxidante de hidrolisado de zeína, peptídeos com baixa massa molecular tem maior afinidade pelo radical DPPH. Vários autores sugerem também que os peptídeos que atingem uma maior atividade nesse método seriam de maior hidrofobicidade (TANG et al. 2010; XIA et al. 2012; RAJAPASKE et al. 2005). Ajibola et al. (2011) estudando a atividade antioxidante de peptídeos de proteínas de feijão africano hidrolisadas com alcalase, mostrou também que peptídeos com baixa massa molecular apresentaram atividade maior comparado aos de maior massa na análise de DPPH. Em geral, a maioria dos pesquisadores acredita que os peptídeos de baixa massa possuem uma

atividade antioxidante maior (ZHU et al., 2008, LI et al., 2008). Em estudo de Zhou e colaboradores (2012), em que avaliaram a atividade antioxidante em hidrolisados obtidos a partir de vísceras de marisco por diferentes proteases, os peptídeos mais eficazes na análise de DPPH tinham diferentes massas moleculares, onde os peptídeos de baixa massa não apresentaram capacidade antioxidante mais forte, como inicialmente esperado.

No método de FRAP, no ensaio sem sal, o resultado se assemelhou à análise de ABTS, onde os peptídeos de maior massa apresentaram maior atividade, mostrando diferença significativa em relação às outras amostras. Essencialmente, não há muita diferença entre o ensaio ABTS e o ensaio FRAP, pois ambos utilizam o mesmo mecanismo de ação que é a transferência de elétrons, a única diferença é que o ABTS é realizado em pH neutro e ensaio FRAP sob condições ácidas (pH 3,6) (HUANG, 2005, PEREZ-JIMENEZ et al., 2008).

Na análise pelo método de ORAC, sem a presença do NaCl, os peptídeos de maior massa foram significativamente mais eficientes como antioxidantes em relação as outras amostras. Ou e colaboradores (2002) realizaram um estudo abrangente comparando o ensaio ORAC com o ensaio FRAP de diferentes vegetais, eles não observaram correlação entre os dois métodos na maioria dos vegetais que testaram e concluíram que ORAC foi um melhor indicador da atividade antioxidante de vegetais ao se comparar com FRAP, com base nos mecanismos de reação envolvidos. Porém, no presente estudo, o comportamento foi similar.

Embora os peptídeos de baixa massa molecular possuam freqüentemente uma elevada atividade antioxidante, existe uma falta de evidência para indicar a faixa exata de massa molecular que engloba os peptídeos mais potentes. Esta discrepância indica que a massa molecular pode não ser o fator mais importante que influencia a atividade antioxidante de hidrolisados ou peptídeos. A composição, as propriedades do peptídeo específico, os meios de reação e o pH podem desempenhar um papel mais crucial. Devido a estas razões, mais de um ensaio deve ser e é freqüentemente utilizado na medição da capacidade antioxidante de um alimento ou de um constituinte alimentar de interesse (TANG, 2014; SAMARANAYAKA E LI-CHAN, 2011).

5.5 – TESTE DE APLICAÇÃO EM MODELO DE ALIMENTO

Este ensaio foi uma tentativa de aplicar os hidrolisados obtidos em um modelo de atividade antioxidante mais parecido com a aplicação em alimentos reais, em comparação com os métodos *in vitro*. Para tanto, amostras de sardinha homogeneizadas foram preparadas e a peroxidação lipídica desses produtos foi avaliada, ao longo do tempo, em diferentes

formas de conservação. Na Figura 24 encontram-se os resultados da análise de TBARs, em amostras de sardinha na presença e na ausência de NaCl. Como pode-se observar na Figura 24, em ambos os casos as amostras adicionadas de BHT e o Branco 1 (congelado) obtiveram os menores valores, indicando menor oxidação lipídica ao longo do tempo de armazenamento, confirmando que o congelamento pode ser uma boa forma de conservação dos pescados, principalmente nas amostras com NaCl, como já avaliado em outros estudos (CHAIJAN, et al., 2006; VEECK, et al., 2013) e também a eficiência do antioxidante sintético utilizado.

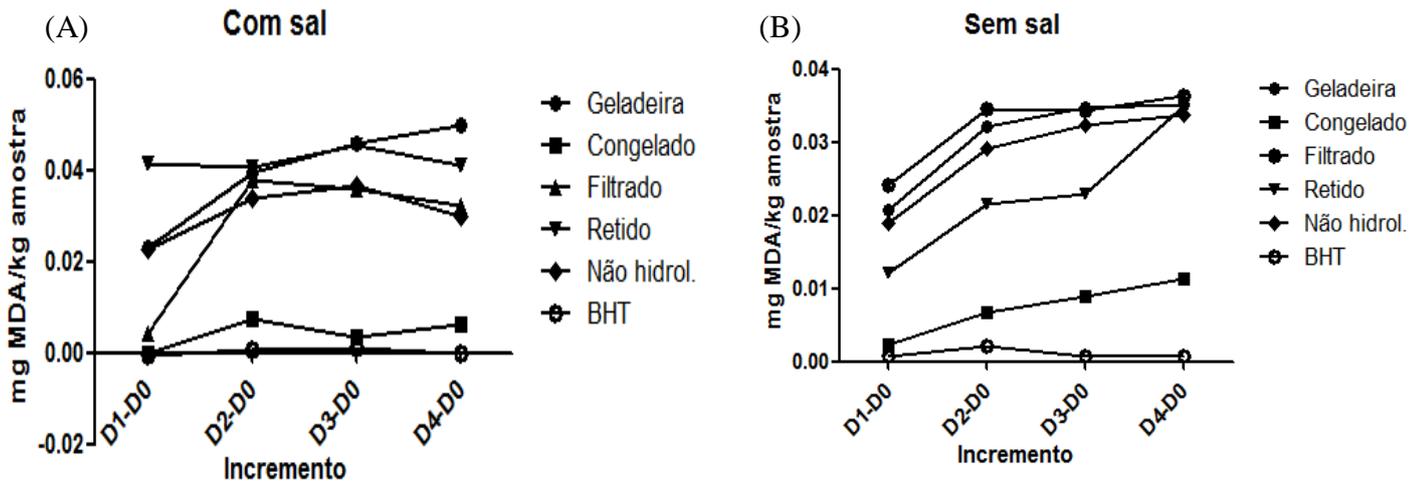


Figura 24. Reação de TBARs em patês de sardinha com adição de hidrolisados de proteína de soja. D0 = Análise após preparo; D1 = 24 horas de armazenamento; D2 = 48 horas de armazenamento; D3 = 72 horas de armazenamento e D4 = 96 horas de armazenamento. (A) As amostras Geladeira e Retido não apresentaram diferença significativa nos tempos D2-D0 e D3-D0; a amostra Geladeira também não diferiu da amostra Não Hidrolisada no tempo D3-D0. As amostras Congelado e BHT não apresentaram diferença significativa nos tempos D1-D0 e as amostras Filtrado e Não hidrolisado não diferiram em D3-D0. (B) As amostras Filtrado, Não Hidrolisado e Geladeira não apresentaram diferença significativa em nenhum dos tempos. As amostras Geladeira, Retido, Filtrado e Não hidrolisado não apresentaram diferença no tempo D4-D0. As amostras BHT e Congelado não diferiram nos tempos D1-D0 e D2-D0. A análise estatística foi realizada por ANOVA ($p < 0,05$).

Podemos observar que a partir dos resultados desse estudo, que as amostras na presença de NaCl, não conseguiram retardar a peroxidação desde o primeiro ponto de análise, com exceção apenas da amostra congelada e com o antioxidante BHT, que apresentaram valores baixos, menores até do que nas amostras sem sal. Com relação às amostras sem sal observamos que os peptídeos com massa molecular < 3 kDa conseguiram retardar a peroxidação nos três primeiros tempos de análise, com o último ponto se mostrando sem diferença estatística com relação às outras amostras. Pode-se observar também que a amostra congelada e com antioxidante BHT apresentaram valores mais baixos de malonaldeído,

porém havendo diferença estatística no terceiro e quarto tempo de análise, mostrando-se o uso de BHT mais eficiente que o congelamento.

Em estudo de Jin e colaboradores (2013), avaliando a atividade antioxidante de enzimas na peroxidação lipídica em carne suína (bacon) com influencia do NaCl, observaram que o NaCl agiu como um agente pró-oxidante mostrando um pior desempenho quando estava em maior quantidade ao longo de um experimento de nove dias, a análise foi realizada também pelo método de TBARs e, segundo os autores, o NaCl inibe a atividade antioxidante não importa qual seja sua concentração. Em outro estudo de Jin e colaboradores (2012), dessa vez com músculos de carne de porco picado, as amostras musculares adicionadas de NaCl apresentaram valores de TBARs significativamente mais elevados ($P < 0,05$) do que o controle (sem adição de NaCl), ao longo do tempo experimental de 7 dias indicando que o sal estaria agindo como pró-oxidante. Os autores relatam ainda, que os valores máximos de interferência de NaCl podem variar de acordo com o tipo de carne. Esses dados corroboram com os encontrados no presente estudo, onde a presença do NaCl prejudicou a atividade antioxidante dos hidrolisados de proteína de soja.

Além da atividade pró-oxidante, o NaCl pode também inibir as atividades enzimáticas antioxidantes endógenas na carne, tais como catalase, glutathione peroxidase e superóxido dismutase e assim, indiretamente promove a oxidação lipídica (LEE et al., 1997; GHEISARI e MOTAMEDI, 2010; HERNÁNDEZ et al., 2002). Por isso, as diferenças nos níveis de concentração de NaCl que atuam como um pró-oxidante podem também estar relacionadas com as diferenças no efeito inibitório de NaCl sobre atividades de enzimas antioxidantes em carnes de diferentes espécies (JI et al., 2012).

O método de TBARS foi utilizado para medir a concentração de produtos de reação secundária relativamente polares, especialmente aldeídos, por isso pode-se observar um aumento nas concentrações ao longo do tempo onde os compostos secundários vão sendo formados e detectados. Observa-se que a amostra tratada com peptídeos > 3 kDa no ensaio sem sal conseguiu retardar a produção desses compostos secundários até o último dia de experimento, confirmando as análises de capacidade antioxidante *in vitro* anteriormente realizadas neste estudo. Rajapaske e colaboradores (2005) relataram que os aminoácidos hidrofóbicos podem contribuir para a inibição da peroxidação aumentando a solubilidade do peptídeo nos lipídeos e assim facilitando uma melhor interação com as espécies radicais, reforçando a hipótese de que os peptídeos > 3 kDa provavelmente seriam hidrofóbicos.

Em estudo de Veeck e colaboradores (2013), em 180 dias de armazenamento congelado, os valores de TBARs aumentaram apenas nas amostras controle sem aspersão e no branco com água destilada, resultando em menores valores de TBARs nos filés de peixe tratados com os extratos de *L. Alba*. Ozogul e colaboradores (2010) fizeram um estudo com files de tilápia, embalados a vácuo, contendo extratos de alecrim, e observaram que os extratos obtiveram valores menores que o do controle na análise de TBARs ao longo de 20 dias, os autores relataram ainda, que a remoção do oxigênio ajudou no lento aumento na concentração de TBA, mostrando que o oxigênio tem grande influência na peroxidação lipídica.

Piccolo e colaboradores (2014), fizeram um estudo com extrato de semente de nêspera em patês de pescado sob refrigeração e não identificaram aumento no nível de TBARs, e como sugestão relataram que os hidroperóxidos podem ter sido degradados em compostos que não podem ser detectados no ensaio TBARS, tais como cetonas, alcoóis, aldeídos (exceto MDA), hidrocarbonetos, ácidos orgânicos voláteis.

6 – CONCLUSÃO

Pode-se concluir com este estudo que o uso de NaCl não obteve valores de rendimento satisfatórios como o esperado, pois foram obtidos resultados inferiores quando comparado à amostra sem sal. A produção de peptídeos bioativos concentrado proteico de soja se mostrou viável tecnicamente. Os peptídeos de maior peso molecular obtidos através de concentrado protéico de soja apresentaram atividade antioxidante maior nas metodologias sem a utilização de NaCl, assim como estes mesmos peptídeos foram capazes de retardar a oxidação lipídica em modelos de alimento. Esses resultados sugerem que hidrolisados de concentrado protéico de soja possuem potencial para ser utilizado como antioxidante e conservante natural em alimentos. Mais estudos devem ser realizados nessa área, para identificar os peptídeos das outras frações e comprovar, com base na seqüência aminoacídica, suas bioatividades.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, L. C.; FREIXO, J. M.; SANTOS, S. C. T.; OKUDA, M. H.; YAMAGUCHI, M. M. Extração protéica do farelo de soja utilizada na formulação de sucedâneo de leite para alimentação animal. **R. Bras. Tecnol. Agroindustr.**, Ponta Grossa, v. 10, n. 1, p. 2079-2094, jan./jun. 2016.
- AJIBOLA, C. F.; FASHAKIN, J. B.; FAGBEMI, T. N.; ALUKO, R. E. Effect of peptide size on antioxidant properties of african yam bean seed (*sphenostylis stenocarpa*) protein hydrolysate fractions. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 12, n. 10, p. 6685-6702, 2011.
- ALLISON, D. B., GADBURY, G., SCHWARTZ, L. G., MURUGESAN, R., KRAKER, J. L., HESHKA, S., FONTAINE, K. R, HEYMSFIELD, S. B. A novel soy-based meal replacement formula for weight loss among obese individuals: a randomized controlled clinical trial. **Eur J Clin Nutr.** v. 57, n. 4, p.514–22, 2003.
- ALUKO, R. E. Antihypertensive peptides from food proteins. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 6, p.235–262, 2015.
- ANDERSON, G. H., MOORE, S. E. Dietary proteins in the regulation of food intake and body weight in humans. **J Nutr.** v.134, n. 4, p. 974S–9S, 2004.
- ANDERSON, J. W., JOHNSTONE, B. M., COOK-NEWELL, M. E. Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. **N Engl J Med** v. 333, p. 276–82, 1995.
- APROSOJA BRASIL, Disponível em: <<http://aprosojabrasil.com.br/2014>> . Acesso em: 12/Dezembro/2016.
- BARBOSA, C. M. S.; MORAIS, H. A.; LOPES, D. C. F.; MANSUR, H. S.; OLIVEIRA, M. C.; SILVESTRE, M. P. C. Microencapsulação de Hidrolisados de Caseína em Lipoesferas Para Mascaram o Sabor Amargo: Avaliação Físico-Química e Sensorial. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 3, 2002.
- BARBOSA, A. C. B.; HASSIMOTTO, N. M.A., LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Teores de isoflavonas e capacidade antioxidante da soja e produtos derivados. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 26, n.4, p. 921-926, out.-dez. 2006
- BEERMANN, C.; EULER, M.; HERZBERG, J. STAHL, B.; Antioxidative capacity of enzymatically released peptides from soybean protein isolate. **Eur Food Res Technol.** v. 229, p. 637-644, 2009.
- BERNAUD, F. S. R.; RODRIGUES, T. C. Fibra alimentar – Ingestão adequada e efeitos sobre a saúde do metabolismo. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 57, n. 6, p. 397 – 405, 2013.
- BEHRENS, J. H; SILVA, M. A. A. P. Atitudes do consumidor em relação à soja e produtos derivados. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 24, n. 3, p. 431-439, jul.-set. 2004.
- BELADI-MOUSAVI, S. S.; HAJIBABAEI, K.; TAMADON, M.; RAFIEIAN-KOPAEI, M. Relationship between free radicals and risk of kidney diseases; the role of antioxidants and their reaction mechanisms. **Ann Res Antioxid.**, v. 1, n. 1, 2016.

BISCARO, L. M. Efeitos da irradiação gama e da cocção sobre aspectos físicos, químicos e sensoriais de cultivares de soja (*Glycine Max Merrill*) com e sem lipoxigenase. Dissertação de Mestrado. **Universidade de São Paulo**, Piracicaba, 2009.

BOLANHO, B. C. Compostos bioativos e potencial antioxidante em derivados de soja. Dissertação de Mestrado. **Universidade Estadual de Londrina**. 2010.

BONATO, E. R.; BONATO, A.L.V. A soja no Brasil: história e estatística. Londrina, EMBRAPA-CNPSo, p. 61. (EMBRAPA-CNPSo. Documentos, 21), 1987.

BOTTERWECK, A.A.M., VERHAGEN, H., GOLDBOEHM, R. A., KLEINJANS, J., BRANDT, P. A. Intake of Butylated Hydroxyanisole and Butylated Hydroxytoluene and Stomach Cancer Risk: Results from Analyses in the Netherlands Cohort Study. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, p. 599-605, 2000

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v.28, p.25-30. 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. Resolução n. 18, Abril de 1999. Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos. Brasília. **Diário Oficial da União**, Brasília, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. Resolução n. 19, de Julho 2008. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos. **Diário Oficial União**, Brasília, 2008.

CAETANO, F. F. Aproveitamento do farelo de soja no desenvolvimento de meios e processos para a obtenção de produtos proteicos e derivados. Tese de Doutorado. **Universidade de São Paulo**, Ribeirão Preto, 2012.

CALLOU, K.R.A. Teor de isoflavonas e capacidade antioxidante de bebidas à base de soja. Dissertação de Mestrado. **Universidade de São Paulo**, São Paulo, 2009.

CAO, G.; ALESSIO, H. M.; CUTLER, R. G. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 14, n. 3, p.303-311, 1993.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 15–25, 2013.

CARVALHO, A. V.; GARCIA, N. H. P.; FARFAN, J. A.; WADA, J. K. A. Caracterização de concentrado e isolado proteico extraído de sementes de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*, Schum). **Braz. J. Food Technol**, v. 12, n. 1, p. 01-08, jan./mar. 2009.

CERQUEIRA, F.M.; MEDEIROS, M.H.G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Quim. Nova**, v. 30, n. 2, p. 441-449, 2007.

CHAKRABARTI, S.; JAHANDIDEH, F.; WU, J. Food-Derived Bioactive Peptides on Inflammation and Oxidative Stress. **BioMed Research International**, Article ID 608979, 2014.

CHAIJAN, M.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; FAUSTMAN, C. Changes of lipids in sardine (*Sardinella gibbosa*) muscle during iced storage. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 83-91, 2006.

CHEN, H. M., MURAMOTO, K., YAMAUCHI, F. Structural analysis of antioxidative peptides from soybean b-conglycinin. **J Agric Food Chem**, v. 43, n. 3, p. 574–8, 1995.

CLEMENTE, A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 11, n. 7, p. 254-262, 2000.

CODA, R.; RIZZELLO, G.; PINTO, D.; GOBBETTI, M. Selected Lactic Acid Bacteria Synthesize Antioxidant Peptides during Sourdough Fermentation of Cereal Flours. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 1087–1096, 2012.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. **Acomp. safra bras. grãos**, v. 1 – Safra 2015/1, n. 6 – Sexto Levantamento, Jan. 2016.

CONTRERAS, M. M.; HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; AMIGO, L.; MARTÍN-ÁLVAREZ, P.J.; RECIO, I. Production of antioxidant hydrolyzates from a whey protein concentrate with thermolysin: Optimization by response surface methodology. **LWT - Food Science and Technology**. v. 44, p. 9-15. 2011.

CREUSOT, N.; GRUPPEN, H. Hydrolysis of whey protein isolate with *Bacillus licheniformis* protease: fractionation and identification of aggregating peptides. **J. Agric Food Chem.**, v. 55, n. 22, p. 9241-50, 2007.

CHRIST-RIBEIRO, A.; BRETANHA, C. C.; GIACOBBO, G.; SOUZA, M. M.; BADIALE-FURLONG, E. Compostos fenólicos extraídos de fontes naturais aplicados como conservadores em massas de pizza. *Revista de Ciencia e Inovação do IF Farroupilha*, v. 1, n. 1, p. 129-138, 2016.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA) – SOJA. **Diferentes usos da soja.** Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op_page=25&cod_pai=29>. Acesso em: 07 Dez. 2016.

ERICKSON, D. R. Practical handbook of soybean processing and utilization. Saint Louis: **AOCS Press**, United Soybean Board, p.584, 1995.

FARIAS, T. C. Determinação da atividade antioxidante de hidrolisado de proteína de soja segundo os métodos DPPH e ABTS. Dissertação (Trabalho de Conclusão de Curso) - **UNIRIO** - 2014.

FELIX, A. P. Avaliação nutricional de derivados proteicos de soja para cães. Dissertação (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná - **UFPR** - 2011.

- FERNÁNDEZ-MUSOLES, R.; MANZANARES, P.; BURGUETE, M. C.; ALBORCH, E.; SALOM, J. B. In vivo angiotensin I-converting enzyme inhibition by long-term intake of antihypertensive lactoferrin hydrolysate in spontaneously hypertensive rats. **Food Research International**, v. 54, p. 627–632, 2013.
- FERRARI, R. A.; DEMIATE, I. M. Isoflavonas de soja – uma breve revisão. **Biological and Health Sciences**, v. 7, n. 1, p. 39-46, 2001.
- FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Assoc. Med. Bras.** v.43, n.1, São Paulo Jan./Mar. 1997.
- FIGUEIREDO, M. G.; BARROS, A. L. M.; GUILHOTO, J.J.M. Relação econômica dos setores agrícolas do Estado do Mato Grosso com os demais setores pertencentes tanto ao Estado quanto ao restante do Brasil. **Rev. Econ. Sociol. Rural**, v.43 n.3 Brasília, Jul./Set. 2005.
- FONTAINE, K. R., YANG, D., GADBURY, G. L., HESHKA, S., SCHWARTZ, L. G., MURUGESAN, R., KRAKER, J. L., HEO, M., HEYMSFIELD, S. B., ALLISON, D. B. Results of soy-based meal replacement formula on weight, anthropometry, serum lipids & blood pressure during a 40- week clinical weight loss trial. **Nutr J.** v. 2, n. 1, p.14, 2003.
- FORNAZIER, V. S. Alimentos funcionais e etapas de pré-comercialização de barra de cereais com mel. Trabalho de Conclusão de Curso, **Universidade de Brasília**, 2012.
- FREITAS, G. L.; KUSKOSKI, E. M.; GONZAGA, L.; FETT, R. Avaliação da atividade antioxidante de diferentes cervejas aplicando os métodos ABTS e DPPH. **Alim. Nutr.**, Araraquara, v.17, n.3, p.303-307, jul./set. 2006.
- GEADA, A. C. G. Filetes de sardinha (*Sardina pilchardus*): efeito da suplementação de antioxidantes naturais na estabilidade oxidativa. Dissertação (Mestrado) - **Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar** - Portugal, 2012.
- GHEISARI, H. R.; MOTAMEDI, H. Chloride salt type/ionic strength and refrigeration effects on antioxidant enzymes and lipid oxidation in cattle, camel and chicken meat. **Meat Science**, v. 86, n. 2, p. 377–383, 2010.
- GHRIBI, A. M.; GAFSI, I. M.; SILA, A.; BLECKER, C.; DANTHINE, S.; ATTIA, H.; BOUGATEF, A.; BESBES, S. Effects of enzymatic hydrolysis on conformational and functional properties of chickpea protein isolate. **Food Chemistry**, v. 187, p. 322–330, 2015.
- GOMES, F. S. Concentração de licopeno de suco de melancia através de processos de separação por membranas. 2009. 105 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - **Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, Seropédica, 2009.
- GÓMEZ-ESTACA, J.; LOPEZ-DE-DICASTILLO, C.; HERNANDEZ-MUÑOZ, P.; CALATÁ, R.; GAVARA, R. Advances in antioxidant active food packaging. **Trends in Food Science & Technology**, v.35, p.42-51, 2014.

GU, Y.; WU, J. LC–MS/MS coupled with QSAR modeling in characterising of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from soybean proteins. **Food Chemistry**, v. 141, p. 2682–2690, 2013.

GUADIX, A.; GUADIX, E. M.; PAEZ-DUEÑAS, M. P.; GONZÁLEZ-TELLO, P.; CAMACHO, F. Procesos Tecnológicos y Métodos de Control en la Hidrólisis de Proteína. **Ars. Pharmaceutica** v.41, n.1, p. 79-89, 2000.

HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. **Bioquímica Ilustrada**. 5ª Edição, p. 1-5, Porto Alegre, 2012.

HERNÁNDEZ, P.; PARK, D.; RHEE, K. S. Chloride salt type/ionic strength, muscle site and refrigeration effects on antioxidant enzymes and lipid oxidation in pork. **Meat Science**, v. 61, n. 4, p. 405–410, 2002.

HIRAOKA, N. K.; BONFLEUR, M. L. A importância do uso da soja na alimentação. 2009. Disponível em: <<http://www.diaadiaeducacao.pr.gov.br/portals/pde/arquivos/2520-8.pdf>> Acesso em: 08 Dez. 2016.

HUANG, D.; OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; FLANAGAN, J. A.; PRIOR, R. L. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, p. 4437-4444, 2002.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. **J. Agric. Food Chem**, v. 53, p. 1841-1856, 2005.

IMURA, T.; NAKAYAMA, M.; TAIRA, T.; SAKAI, H.; ABE, M.; KITAMOTO, D. Interfacial an emulsifying properties of soybeans peptides with different degrees of hydrolysis. **Journal of Oleo Science**. v. 64, n. 2, p. 183-189, 2015.

INDRANUPAKORN. R., SOBHARAKSHA P., LUANGTANA-ANAN, M. Antioxidant activities of the soybean extracts obtained by classical extraction. **IJPS**. v. 6, n..3, p. 113-121, 2010.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (**IBGE**). Produção de soja no Brasil. 2016. Disponível em:<[http:// www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br)> Acesso em 10/12/2016.

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

JEONG, H.J.; LAM, Y.; LUMEN, B.O. Barley Lunasin Suppresses *ras*-Induced Colony Formation and Inhibits Core Histone Acetylation in Mammalian Cells. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, n.21, p. 5903–5908, 2002.

JI, N., SUN, C., ZHAO, Y., XIONG, L., SUN, Q. Purification and identification of antioxidant peptides from peanut protein isolate hydrolysates using UHR-QTOF mass spectrometer. **Food Chemistry**, v. 161, p. 148–154, 2014.

JIN, G.; HE, L.; ZHANG, J.; YU, X.; WANG, J.; HUANG, F. Effects of temperature and NaCl percentage on lipid oxidation in pork muscle and exploration of the controlling method using response surface methodology (RSM). **Food Chemistry**, v. 131, p. 817–825, 2012.

JIN, G.; HE, L.; YU, X.; ZHANG, J.; MA, M. Antioxidant enzyme activities are affected by salt content and temperature and influence muscle lipid oxidation during dry-salted bacon processing. **Food Chemistry**, v. 141, p. 2751–2756, 2013.

KIM, M. J.; YANG, H. J.; KIM, J. H.; AHN, C. W.; LEE, J. H.; KIM, K. S.; KWON, Y. Obesity-related metabolomic analysis of human subjects in black soybean peptide intervention study by ultraperformance liquid chromatography and quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Obesity**. Volume 2013, Article ID 874981, 2013.

KITTS, D. D.; WEILER, K. Bioactive Proteins and Peptides from Food Sources. Applications of Bioprocesses used in Isolation and Recovery. **Current Pharmaceutical Design**, v. 9, n. 16, p. 1309-1323, 2003.

KITZBERGER, C. S. G.; SMÂNIA, A. J.; PEDROSA, R. C.; FERREIRA, S.R.S. Antioxidant and antimicrobial activities of shiitake (*Lentinula edodes*) extracts obtained by organic solvents and supercritical fluids. **Journal of Food Engineering**. London, v. 80, n. 2, p. 631-638, 2007.

KORHONEN, H. Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. **Journal of functional foods**. v. 1, p. 177-187. 2009.

KORHONEN, H., AND A. PIHLANTO. Bioactive peptides: Production and functionality. **Int. Dairy J.** v. 16, p. 945–960, 2006.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; MORALES, M. T.; FETT, R. Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.4, p.1283-1287, jul-ago, 2005.

LAMSAL, B. P.; JUNG, S.; JOHNSON, L.A. Rheological properties of soy protein hydrolysates obtained from limited enzymatic hydrolysis. **LWT**, n. 40, p. 1215–1223, 2007.

LEE, S. K.; MEI, L.; DECKER, E. A. Influence of sodium chloride on antioxidant enzyme activity and lipid oxidation in frozen ground pork. **Meat Science**, v. 46, n. 4, p. 349-355, 1997.

LI, X. X., HAN, L. J., CHEN, L. J. In vitro antioxidant activity of protein hydrolysates prepared from corn gluten meal. **J. Sci. Food Agric.** v. 88, p. 1660–1666, 2008.

LI-CHAN, E. C. 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.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n. 3, 2001.

LIMA, G. F. Aditivos alimentares: definições, tecnologia e reações adversas. **Revista Eletrônica de Ciências** - v. 4, n. 2, 2011.

- LIU, K. **Soybeans**: chemistry, technology and utilization. New York: Chapman & Hall, p. 395, 1997.
- LIU, Q.; YAO, H. Antioxidant activities of barley seeds extracts. **Food Chem.**; v. 102, n. 732-737, 2007.
- LOWRY, O.H; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. **Journal of Biological Chemistry**. 193: 265-275. 1951.
- LUI, M. C.; AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; SCAMPARINI, A. R. P.; PARK, Y. K. Isoflavonas em isolados e concentrados protéicos de soja. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 23, p. 206-212, 2003.
- LULE, V. K.; GARG, S.; POPHALY, S. D.; H.; TOMAR, S. K. Potential health benefits of lunasin: a multifaceted soy-derived bioactive peptide. **Journal of Food Science**. v. 80, n. 3, p.485 - 494, 2015.
- LUNA-VITAL, D. A., MOJICA, L., GONZ´ALEZ DE MEJÍA, E., MENDOZA, S. & LOARCA-PIÑA, G., Biological potential of protein hydrolysates and peptides from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): A review, **Food Research International** (2014), doi: 10.1016/j.foodres. 2014.
- LUO, Y.; PAN, K.; ZHONG, Q. Physical, chemical and biochemical properties of casein hydrolyzed by three proteases: Partial characterizations. **Food Chemistry**, n. 155, p. 146–154, 2014.
- MARTINEZ, A. P. C. Efeitos dos processos de irradiação e germinação nos aspectos nutricionais, sensoriais e microbiológicos em grãos de soja (*Glycine Max Merril*) cultivar BRS216. Dissertação de Mestrado. **Universidade de São Paulo**, Piracicaba, 2011.
- MATOBA, T. How does the radical-scavering activity of soy protein food change during heating? **Soy Protein Research**. v. 5, p. 47-50, 2002.
- MEIJA, E.; LUMEN, B.O. Soybean bioactive peptides: A new horizon in preventing chronic diseases. **Sexuality, Reproduction & Menopause**, v. 4, n. 2, 2006.
- MENDIS, E., RAJAPAKSE, N., KIM, S. K. Antioxidant properties of a radicals scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. **J Agric Food Chem**, v. 53, p. 581–7, 2005.
- MENON, S.; LU, C.; MENON, R.; SCHWARTZ, J.; GUAN, Y. Effects of Antioxidants in Human Cancers: Differential Effects on Non-Coding Intronic RNA Expression. **Antioxidants**, v. 5, n. 1, 2016.
- MELLO, V. D.; LAAKSONEN, D. E. Fibras na dieta: tendências atuais e benefícios à saúde na síndrome metabólica e no diabetes melito tipo 2. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 53, n.5, p. 509 – 518, 2009.
- MELO, E. A.; MACIEL, M. I. S.; LIMA, V. L. A. G.; LEAL, F. L. L.; CAETANO, A. C. S.; NASCIMENTO, R. J. Capacidade antioxidante de hortaliças usualmente consumidas. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** v.26, n.3, Campinas Jul./Set. 2006.

- MELO, E. A.; MACIEL, M. I. S.; LIMA, V. L. A. G.; NASCIMENTO, R. J. Capacidade antioxidante de frutas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 44, n. 2, abr./jun., 2008.
- MISSÃO, M. R. Soja: Origem, classificação, utilização e uma visão abrangente do mercado. *Maringá Management: Revista de Ciências Empresariais*, v. 3, n.1, p.7-15, jan./jun. 2006.
- MITCHELL, R. A. C.; LOVEGROVE, A.; SHEWRY, P. R. Lunasin in cereal seeds: What is the origin? *J Cereal Sci.* v. 57, n. 3, p. 267–269, 2013.
- MIYAOKA, M. F. Avaliação do potencial dos fungos do gênero *Rhizopus* spp na produção de substâncias bioativas com ação antioxidante utilizando diferentes substratos. Dissertação de Mestrado, **Universidade Federal do Paraná**, Curitiba, 2012.
- MONTEIRO, M. R. P.; Avaliação da digestibilidade e da qualidade proteica de linhagens de soja com ausência do inibidor de tripsina kunitz e das isoenzimas lipoxigenases. **Universidade Federal de Viçosa**, Minas Gerais, Brasil, 2000.
- MORAIS, A. A. C. Valor nutritivo e funcional da soja/ Nutritive and functional value of soybean. *Rev. bras. Nutr.clín.* v. 15, n. 2, p. 306-15, abr.-jun. 2000.
- MORAIS, S. M.; CAVALCANTI, E. S. B.; COSTA, S. M. O; AGUIAR, L. A. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 19, n.1B, p. 315-320, Jan./Mar. 2009.
- MORALES, F. P.; COLLA, L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. *Revista Eletrônica de Farmácia.* v. 13, n. 2, p. 109-122, 2006.
- MOURE, A.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J.C. Antioxidant properties of ultrafiltration-recovered soy protein fractions from industrial effluents and their hydrolysates. *Process Biochemistry.* v. 41, p. 447–456, 2006.
- MYERS, R. H., MONTGOMERY, R. C. **Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments**, Wiley, New York, 2002.
- NAGAOKA, S.; AWANO, T.; NAGATA, N.; MASAOKA, M.; HORI, G.; HASHIMOTO, K. Serum Cholesterol Reduction and Cholesterol Absorption Inhibition in CaCo-2 Cells by a Soyprotein Peptic Hydrolyzate, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 61, n. 2, p. 354-356, 1997.
- NATESH R, SCHWAGER SL, STURROCK ED, ACHARYA KR. Crystal structure of the human angiotensin-converting enzyme-lisinopril complex. *Nature.* v. 421, n. 6922, p. 551–4, 2003.
- NETO, J. T. S.; VANDESMET, L. C. S. A importância da proteína no exercício físico: uma revisão literária. Encontro de Extensão, Docência e Iniciação Científica (EEDIC), 12, 2016, Quixadá. Anais. Quixadá: **Centro Universitário Católica de Quixadá**, 2016. ISSN: 2446-6042.

- NEVES, J. A. Desempenho agrônômico de genótipos de soja sob condições de baixa latitude em Teresina – PI. Dissertação de Pós-graduação. **Universidade Federal do Piauí**, Teresina, 2011.
- NIMSE, S. B.; PAL, D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. **RSC Adv.**, v. 5, p. 27986–28006, 2015.
- NISHINARI, K.; FANG, Y.; GUO, S.; PHILLIPS, G. O. Soy proteins: A review on composition, aggregation and emulsification. **Food Hydrocolloids**, v. 39, p. 301–318, 2014.
- OHR, L. M. Weighing in on weight control. **Food Technol.** v. 59, n. 3, p. 53–5, 2005.
- OLIVEIRA, C. F. Estudo da hidrólise da proteína de soja utilizando proteases de *Chryseobacterium sp.* para o uso como antioxidante em alimentos. Dissertação de mestrado, **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, 2011.
- OLIVEIRA, G. F. Desenvolvimento e caracterização de isolado protéico de soja modificado com hexametáfosfato de sódio. Dissertação de mestrado, **Universidade Federal de Viçosa**, 2010.
- OSAWA, C. C.; FELICIO, P. E.; GONÇALVES, L. A. G. Teste de tba aplicado a carnes e derivados: métodos tradicionais, modificados e alternativos. **Quim. Nova**, Vol. 28, No. 4, 655-663, 2005.
- OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R. L. Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. **J. Agric. Food Chem.**, v. 49, n. 10, p. 4619–4626, 2001.
- OZOGUL, Y.; AYAS, D.; YAZGAN, H.; OZOGUL, F.; BOGA, E. K.; OZYURT. The capability of rosemary extract in preventing oxidation of fish lipid. **Food Science and Technology**, v. 45, n. 8, p. 1717–1723, 2010.
- PASSOTTO, J. F.; PENTEADO, M. V. C.; MANCINI-FILHO, J. Atividade antioxidante do β -caroteno e da vitamina A. Estudo comparativo com antioxidante sintético. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.18, n.1, 1998.
- PAULA, S.R.; FILHO, P. F. Panorama do complexo soja. 1999. Disponível em: <<http://www.inagro.org.br/publicacoes/Soja.pdf>>. Acesso em: 07 Abr. 2014.
- PENHA, L. A. O; FONSECA, I. C. B.; MANDARINO, J. M.; BENASSI, V. T. A soja como alimento: valor nutricional, benefícios para a saúde e cultivo orgânico. **B. CEPPA**, Curitiba, v. 25, n. 1, p. 91-102, jan./jun. 2007.
- PEREIRA, D.; PINHEIRO, R.S. Elaboração de hambúrgueres com antioxidantes naturais oriundos de extratos etanólicos de alecrim (*Rosmarinus officinalis. L.*). Trabalho de Conclusão de Curso, **Universidade Tecnológica Federal do Paraná**, Pato Branco, 2013.
- PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.D.; ARRANZ, S.; TABERNERO, M.; RUBIO, M. E. D.; SERRANO, J.; GOÑI, I. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. **Food Research International**, v. 41, p. 274–285, 2008.

- PERICIN, D., RADULOVÍČ-POPOVÍČ, L., VASTAG, Z., MADAREV-POPOVÍČ, S., TRIVIC, S. Enzymatic hydrolysis of protein isolate from hull-less pumpkin oil cake: application of response surface methodology. **Food Chem**, v. 115, p. 753–757, 2009.
- PICCOLO, J., DANIEL, A. P., FERREIRA, L. F., RUVIARO, A. R., EMANUELLI, T., KUBOTA, E. H. Oxidative stability of refrigerated fish pates containing loquat seed extract. **Cienc. Rural**, v.44, n.9, 2014.
- PIHLANTO, A. Antioxidative peptides derived from milk proteins. **Int Dairy J.**, v.16, p. 1306–1314, 2008.
- PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **J. Agric. Food Chem.** v. 53, n.10, p. 4290–4302, 2005
- PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. **J. Agric. Food Chem.**, v. 48, n. 8, p. 3396–3402, 2000.
- RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 755–760, 2006.
- RAMARATHNAM, N.; OSAWA, T.; OCHI, H.; KAWAKISHI, S. The contribution of plant food antioxidants to human health. **Trends Food Sci. Technol.**, v. 6, n. 3, p. 75–82, 1995.
- RAJAPAKSE, N.; MENDIS, E.; JUNG, W. K.; JE, J. Y.; KIM, S. K. Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties. **Food Res. Int.** v. 38, p. 175–182, 2005.
- RAYAPROLU, S. J.; HETTIARACHCHY, N. S.; CHEN, P.; KANNAN, A.; MAUROMOSTAKOS, A. Peptides derived from high oleic acid soybean meals inhibit colon, liver and lung cancer cell growth. **Food Research International**, doi: 10.1016/j.foodres.2012.10.021, 2012.
- RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 26, p. 1231–1237, 1999.
- RESENDE, D. F. Estudo comparativo de características físico-químicas e nutricionais da soja preta e amarela. Dissertação de Mestrado, **Universidade de São Paulo**, São Paulo, 2012.
- RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biol. Med.**, v. 20, p.933–956, 1996.
- 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**, v. 27, p. 549–569, 2016.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos: uma estratégia sequencial de planejamentos, Campinas, SP, Casa do Pão Editora, 2005.

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.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS +. **Comunicado técnico.** Embrapa, Fortaleza, CE. 2007.

SALVADOR, I. Atividade antioxidante e teor de resveratrol em cacau, chocolates, achocolatados em pó e bebidas lácteas achocolatadas. Dissertação de Mestrado. **Universidade de São Paulo.** Piracicaba, 2011.

SMARANAYAKA, A. G. P.; LI-CHAN, E. C. Y. Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. **Journal of Functional Foods**, p.229-254, 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, DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.01.069>.

SANJUKTA, S., RAJ, A.K., Production of bioactive peptides during soybean fermentation and their potential health benefits, **Trends in Food Science & Technology**, 2016, doi: 10.1016/j.tifs.2016.01.010.

SANT'ANNA, M. S. L.; FERREIRA, C. L. L. F. Prevalência de constipação intestinal no município de Viçosa/MG. **Nutrição Brasil**, v. 15, n. 1, 2016.

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. D.; MARTINS, V. G.; SALAS-MELLADO, M.; PRENTICE-HERNANDEZ, C. Otimização dos parâmetros de produção de hidrolisados protéicos enzimáticos utilizando pescado de baixo valor comercial. **Quim. Nova**, v. 32, n. 1, p. 72-77, 2009.

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

SMITH, A. K.; CIRCLE, S. J. **Soybeans:** chemistry and technology. Westport: Avi Publishing, p. 294, 1972.

SCHMIDT, C. G.; MELLADO, M. S. Influência da ação das enzimas alcalase e flavourzyme no grau de hidrólise das proteínas de carne de frango. **Quím. Nova**. v.32 n.5. São Paulo 2009.

- SGARBIERI, V. C.; PACHECO, M. T. B. Revisão: Alimentos Funcionais Fisiológicos. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v.2, n.1,2, p.7-19, 1999.
- SILVA, H. L. Efeito da fermentação utilizando *Aspergillus oryzae* sobre as características funcionais, tecnológicas e físico-químicas da farinha de soja integral e aplicação em pão de forma funcional. Dissertação de Doutorado. **Universidade Estadual de Campinas**. 2009.
- SILVA, O. S.; LAURENTINO, T. N. S.; OLIVEIRA, R. L.; PORTO, T. S.; LAURENTINO, T. N. S.; OLIVEIRA, R. L.; PORTO, T. S. Caracterização parcial de proteases por *aspergillus tamarii* urm4634 por fermentação em estado sólido (FES). XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Florianópolis/SC, 2014.
- SINGH, B. P.; VIJ, S.; HATI, S. Functional significance of bioactive peptides derived from soybean. **Peptides**, v. 54, p. 171–179, 2014.
- SOARES, M. Avaliação do desempenho zootécnico do camarão branco do Pacífico alimentado com dietas com diferentes níveis de substituição de farinha de peixe por concentrado proteico de soja. Dissertação (Mestrado em Agricultura) - Universidade Federal de Santa Catarina - **UFSC** - 2014.
- SOARES, N. B. Obtenção de hidrolisado proteico de torta de soja e avaliação de sua atividade antimicrobiana. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – **UNIRIO** – Rio de Janeiro, 2013.
- SOUISSI, N.; BOUGATE, A.; TRIKI-ELLOUZ, Y.; NASRI, M. Biochemical and functional properties of Sardinella (*Sardinella aurita*) by-product hydrolysates. **Food Technology & Biotechnology**, v. 45, n. 2, p. 187–194, 2007.
- SOUZA, M. A. A Casca da batata inglesa (*Solanum tuberosum*) na proteção antioxidante da carne de frango. Dissertação de mestrado, **Universidade Federal de Santa Maria**, Rio Grande do Sul, 2006.
- SORGENTINI, D. A.; WAGNER, J. R. Comparative study of foaming properties of whey and isolate soybean proteins. **Food Research International**, v. 35,n. 8, p. 721–729, 2002.
- STRÖHER, R. Hidrólise enzimática da proteína do farelo de soja. Dissertação de Mestrado, **Universidade Estadual de Maringá**, Paraná, 2010.
- SUETSUNA, K., NAKANO, T. Identification of an antihypertensive peptide from peptic digest of wakame. **J. Nutr. Biochem.** v. 11, p. 450–454, 2000.
- TANG, N.; ZHUANG, H. Evaluation of Antioxidant Activities of Zein Protein Fractions. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 11, 2014.
- TANG, X.; HE, Z.; DAI, Y.; XIONG, Y. L.; XIE, M.; CHEN. Peptide fractionation and free radical scavenging activity of zein hydrolysate. **J. Agric. Food Chem.** v. 58, n. 1, p.587-593, 2010.

TAKAHASHI, O., HIRAGA, K. Dose-Response Study of Hemorrhagic Death by Dietary Butylated Hydroxytoluene (BHT) in Male Rats. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 43, p. 399-406, 1978.

TAVANO, O. L. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 90, p. 1–11, 2013.

TINTORE, G. S.; GUERRERO, L. C.; RIOS, L. J. C.; AYALA, A. L. M. Peptidos com actividad antioxidante de proteínas vegetales. **OmniaScience**, p. 111- 122, 2013. Barcelona, 2013.

TOGNI, D. A. J. Contribuição do tratamento de sementes de soja (*Glycine Max Merrill*) com fungicidas no manejo da ferrugem asiática. Dissertação de Mestrado. **Universidade de São Paulo**, Piracicaba, 2008.

UFRGS. **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/alimentus/objetos-de-aprendizagem/soja/concentrado-proteico>> Acesso em: 10 Jan. 2016.

USDA - UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Production, Supply and Distribuiton Online. Disponível em: <<https://www.usda.gov>>. Acesso em: 12 dez 2016.

VASCONCELLOS, F. C. S. Produção e caracterização de um isolado proteico de soja, avaliação das atividades biológicas antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória das proteínas glicinina e β - conglucina e produção de um fitocosmético. Dissertação de Doutorado. **Universidade Federal do Paraná**. 2014.

VEECK, A. P. L.; KLEIN, B.; FERREIRA, L. F.; BECKER, A. G.; HELDWEIN, C. G.; HEINZMANN, B. M.; BALDISSEROTTO, B.; EMANUELLI, T. Lipid stability during the frozen storage of fillets from silver catfish exposed *in vivo* to the essential oil of *Lippia alba* (Mill.) NE Brown. **J Sci Food Agric**, v. 93, p. 955–960, 2013.

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.

VIEIRA, C. R. Extração, Hidrólise e remoção de fenilalanina das proteínas de farinha de arroz. Dissertação de mestrado, **Universidade Federal de Minas Gerais**, Belo Horizonte, 2007.

VIEIRA, C. R.; CABRAL, L. C.; PAULA, A. C. O. Composição centesimal e conteúdo de aminoácidos, ácidos graxos e minerais de seis cultivares de soja destinadas à alimentação humana. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.34, n.7, p.1277-1283, jul. 1999.

VIEIRA, F. S. Avaliação da atividade antiangiogênica do peptídeo sintético análogo a lunasina e do inibidor bowman-birk em membrana corioalantóica de gallus domesticus. Dissertação de Mestrado. **Universidade Federal de Ouro Preto**, Minas Gerais, 2014.

VYNCKE, W. Direct determination os the thiobarbituric acid in trichoracetic acid extracts of fish as a measure os oxidative rancidity. **Symposium of Research Workers**, n. 12, p.1084 - 1087, 1970.

- XIA, Y.; BAMDAD, F.; GANZLE, M.; CHEN, L. Fractionation and characterization of antioxidant peptides derived from barley glutelin by enzymatic hydrolysis. **Food Chemistry**, v. 134, n. 3, p. 1509-1518, 2012
- XU, J.; ZHAO, Q.; QU, Y.; YE, F. Antioxidant activity and anti-exercise-fatigue effect of highly denatured soybean meal hydrolysate prepared using neutrase. **J Food Sci Technol**. DOI 10.1007/s13197-013-1220-7, 2013.
- WANG, Q.; LI, W.; HE, Y.; REN, D.; KOW, F.; SONG, L., YU, X. Novel antioxidative peptides from the protein hydrolysate of oysters (*Crassostrea talienwhanensis*). **Food Chemistry**, n.145, p. 991–996, 2014.
- WANG, X.; WANG, Y.; CHENG, X.; ZHOU, J.; TANG, X.; MAO, X. Y. Hypertension-attenuating effect of whey protein hydrolysate on spontaneously hypertensive rats. **Food Chemistry**, v. 134, p. 122–126, 2012.
- WANG, W.; MEJIA, E. G. A new frontier in soy bioactive peptides that may prevent age-related chronic diseases. *Comprehensive reviews in food science and food safety*. **Wiley Online Library**. vol. 4, 2005.
- WATTANASIRITHAM, L.; THEERAKULKAIT,C.; WICKRAMASEKARA, S.; MAIER, C. S.; STEVENS, J. F. Isolation and identification of antioxidant peptides from enzymatically hydrolyzed rice bran protein. **Food Chemistry**, n. 192, p.156–162, 2016.
- WITSCHI, H., LOCK, S. Toxicity of butylated hydroxytoluene in mouse following oral administration. **Toxicology**, v. 9, p. 137—146, 1978.
- YANG, R.; WANG, J.; LIN, S. Isolation and purification of soybean antioxidant peptides. **Advanced Materials Research**, v. 881-883, p 811-814, 2014.
- YANG, B.; YANG, H.; LI, J.; LI, Z.; JIANG, Y. Amino acid composition, molecular weight distribution and antioxidant activity of protein hydrolysates of soy sauce lees. **Food Chemistry**. v. 124, p. 551–555, 2010.
- 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.
- YOU, S. J.; UDENIGWE. C. C.; ALUKO, R. E.; WU, J. Multifunctional peptides from egg white lysozyme. **Food Research International**, v. 43, p. 848–855, 2010.
- YUST, M. D. M. et al. Improvement of functional properties of chickpea proteins by hydrolysis with immobilised Alcalase®. **Food Chemistry**, London, v. 122, n. 4, p. 1212-1217, 2010.
- ZAKIR, M. M.; FREITAS, I. R. Benefícios à saúde humana do consumo de isoflavonas presentes em produtos derivados da soja. **J. Bioen. Food Sci**, v. 02, n. 3, p. 107-116, 2015.
- ZHANG, H.; BARTLEY, G. E.; ZHANG, H.; JING, W.; FAGERQUIST, C. K.; ZHONG, F.; YOKOYAMA, W. Peptides identified in soybean protein increase plasma cholesterol in mice on hypercholesterolemic diets. **J. Agric. Food Chem.**, v. 61, p. 8389–8395, 2013.

ZHANG, L.; LI, J.; ZHOU, K. Chelating and radical scavenging activities of soy protein hydrolysates prepared from microbial proteases and their effect on meat lipid peroxidation. **Bioresource Technology** v. 101, p. 2084–2089, 2010.

ZHONG, F.; LIU, J.; MA, J.; SHOEMAKER, C. F. Preparation of hypocholesterol peptides from soy protein and their hypocholesterolemic effect in mice. **Food Research International**, v. 40, n. 6, p. 661–666, 2007.

ZHOU, D. Y.; ZHU, B. W.; WU, H. T.; LI, D. M.; YANG, J. F.; MURATA, F. In vitro antioxidant activity of enzymatic hydrolysates prepared from abalone (*Haliotis discus hannai* Ino) viscera. **Food and Bioprocess Processing**, v. 90, p. 148–154, 2012.

ZHU, L., CHEN, J., TANG, X., XIONG, Y.B. Reducing, radical scavenging, and chelation properties of in vitro digests of alcalase-treated zein hydrolysate. **J. Agric. Food Chem.** v. 56, p. 2714–2721, 2008.

APÊNDICE

Apêndice 1 - Curva padrão da solução de TEP (1,1,3,3- tetraetoxipropano) utilizada para análise de TBARs. Essa curva representa o modelo de todas as curvas utilizadas neste trabalho.

