

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS

Luan Felipe Santana Costa

BIOATIVIDADE DE PEPTÍDEOS DO SORO DE LEITE OBTIDOS
POR HIDRÓLISE E ULTRAFILTRAÇÃO EM CONDIÇÕES
GASTROINTESTINAL SIMULADAS

Passo Fundo
2021

Luan Felipe Santana Costa
Farmacêutico

**BIOATIVIDADE DE PEPTÍDEOS DO SORO DE LEITE OBTIDOS
POR HIDRÓLISE E ULTRAFILTRAÇÃO EM CONDIÇÕES
GASTROINTESTINAL SIMULADAS**

Dissertação apresentada como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Vandrê Barbosa Brião

Linha de pesquisa: Qualidade e propriedades funcionais de alimentos

Passo Fundo

2021

CIP – Catalogação na Publicação

C837b Costa, Luan Felipe Santana
Bioatividade de peptídeos do soro de leite obtidos por
hidrólise e ultrafiltração em condições gastrointestinal
simuladas / Luan Felipe Santana Costa. – 2021.
96 f. : il. color. ; 30 cm.

Orientador: Vandrê Barbosa Brião.
Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de
Alimentos.) – Universidade de Passo Fundo, 2021.

1. Soro do leite. 2. Peptídeos. 3. Digestão. 4. Alimentos
– Indústria. I. Brião, Vandrê Barbosa, orientador. II. Título.

CDU: 664

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS**

A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

**“Bioatividade de peptídeos do soro de leite obtidos por hidrólise e ultrafiltração
em condições gastrointestinal simulada”**

Elaborada por
Luan Felipe Santana Costa

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Comissão Examinadora



**Vandrê Barbosa Brião, Dr., UPF
(Orientador/Presidente)**



Telma Elita Bertolin, Dra., UPF



Juliana Steffens, Dra., URI

**Passo Fundo, RS, Brasil
2021**

AGRADECIMENTOS

Sem o apoio de várias pessoas não seria possível à conclusão desse mestrado.

Em primeiro lugar quero agradecer imensamente ao meu orientador, Professor Dr. Vandré Barbosa Brião, por toda a paciência, empenho, por ser mais que um orientador de mestrado, orientador da vida e amigo. Muito obrigado por corrigir quando necessário e nunca desmotivar.

Agradeço as minhas companheiras diárias Ana Carolina Matana e Sandrini Slongo, que sempre estavam comigo desde os primeiros dias nos laboratórios, cujo apoio e amizade estiveram presentes em todos os momentos. Igualmente agradeço a Jéssica Stefanello e Bárbara Biduski por passar horas revendo os cálculos e metodologia. Agradeço a todos os Mestrandos e Doutorandos do PPGCTA e PPGENG: a Danúbia Favaretto e a Lara Franco que emprestaram reagente e ajudaram muito na metodologia, Mateus Nazari, Alan Rempell, César Tonicio, Camila Favrettos, Thanise Dias e Jaqueline Rumão, todos eles de alguma forma contribuíram com esse trabalho. Aos graduandos em Engenharia química Mateus Benvegnu e Guilherme Giubel pelo apoio no laboratório.

Agradeço aos funcionários dos laboratórios João e Nara, e também a Daniela da secretaria por sempre atender com muito prestatividade. Agradeço a coordenadora Luciane Colla por tudo que fez por nos durante esses 2 anos.

Agradeço aos Professores da URI, de Erechim, por seder parte do seu tempo em analisar as amostras na Eletroforese e ao Alessandro Sbeghen que levou as amostras.

Por último, quero agradecer à minha família e amigos pelo apoio incondicional que me deram especialmente a minha esposa Lorena Marina que sempre me acompanhou nas madrugadas a escrita dessa dissertação, pelas várias revisões deste trabalho e ainda até ajudou nos experimentos nos laboratórios nos finais de semana.

O rio atinge seus objetivos porque aprendeu a contornar obstáculos.

Lao-Tsé.

RESUMO

O soro de leite bovino possui múltiplos atributos de promoção da saúde, sendo uma fonte de biopeptídeos com alto valor biológico. O objetivo do trabalho foi hidrolisar proteínas do soro de leite para produzir peptídeos purificados por ultrafiltração, avaliando o efeito gastrointestinal na bioatividade desses peptídeos. A hidrólise das proteínas do soro de leite concentrado foi realizada combinando duas enzimas proteolíticas (Alcalase e Neutrase), utilizando-se uma membrana de ultrafiltração de 10 kDa para fazer a purificação dos peptídeos produzidos. Após, levou-se os peptídeos à simulação gastrointestinal *in vitro*, avaliando o seu efeito em diferentes atividades biológicas (antioxidante, anti-inflamatória e antidiabética). Os resultados indicaram que a combinação de enzimas Alcalase e Neutrase aumenta significativamente o grau de hidrólise, em conjunto com operação de Ultrafiltração, permite obtenção de peptídeos de baixo peso molecular que apresentaram melhora de atividade biológica após digestão. Os valores no final da etapa intestino pelo método inibidor do radical ABTS com Concentrado proteico do soro de leite (CPS) foram ($108 \pm 4,41 \mu\text{mol}$ de TE/g de proteína mL^{-1}); permeado hidrolisado de Alcalase+Neutrase (A+N) ($184,2 \pm 5,22 \mu\text{mol}$ de TE/g de proteína mL^{-1}); FRAP com CPS ($14,1 \pm 2,01 \mu\text{mol}$ de TE/g de proteína mL^{-1}); A+N ($51,63 \pm 2,45 \mu\text{mol}$ de TE/g de proteína mL^{-1}); método Anti-HOCl com CPS ($349,1 \pm 29,21 \mu\text{mol}$ de AC/g de proteína mL^{-1}); A+N ($387,3 \pm 61,47 \mu\text{mol}$ de AC/g de proteína mL^{-1}); Anti- α -Amilase com CPS IC_{50} ($0,009 \pm 0,0007$ g de proteína mL^{-1}); A+N IC_{50} ($0,0063 \pm 0,0003$ g de proteína mL^{-1}). Os resultados da combinação de enzimas, aliados a ultrafiltração, diminuíram o peso molecular e melhoraram a biodisponibilidade, contribuindo com o desenvolvimento de peptídeos com maior capacidade funcional, em relação à proteína íntegra, pós-digestão. O perfil molecular, mostrou diminuição de proteínas de peso molecular de 100 a 250 kDa após a Ultrafiltração, comprovando que a UF é um método adequado para a purificação dos peptídeos de baixo peso molecular, sendo encontrados peptídeos exclusivos <10kDa. Sendo assim, a bioatividade pode ser melhorada com a digestão, combinada com hidrólise e ultrafiltração, especialmente ocorre mudança rápida quando adicionado as enzimas pancreáticas. As bioatividades como a ação anti-inflamatória, antidiabética e antioxidante está realacionada com os peptídeos liberados pela ação das enzimas pancreáticas, observando aumento rápido após adição dessas enzimas. Embora não tenha diferenças significativas da ação anti-inflamatória após digestão dos peptídeos hidrolisados previamente, contra os não hidrolisado previamente, foi observado melhora em relação a proteína íntegra. A digestão altera o perfil de peptídeos, os resultados sugerem forte potencial de aplicação dos peptídeos como ingrediente de enriquecimento alimentar, alimento funcional e suplementação com a finalidade de ação Antioxidante, Anti-inflamatória e Antidiabética.

Palavras-chave: Biopeptídeos. Atividade biológica. Whey protein hidrolisado. Digestão gastrointestinal.

ABSTRACT

Bovine whey has multiple health-promoting attributes and is a source of biopeptides with high biological value. The objective of the work was to hydrolyze whey proteins to produce peptides purified by ultrafiltration, evaluating the gastrointestinal effect on the bioactivity of these peptides. The hydrolysis of concentrated whey proteins was performed by combining two proteolytic enzymes (Alcalase and Neutrase), using a 10 kDa ultrafiltration membrane to purify the peptides produced. Afterwards, the peptides were taken to gastrointestinal simulation in vitro, evaluating their effect on different biological activities of the peptides (antioxidant and anti-inflammatory activity). The results indicated that the combination of Alcalase and Neutrase enzymes significantly increases the degree of hydrolysis, in conjunction with Ultrafiltration operation, allows obtaining low molecular weight peptides with improved biological activity after digestion. The values at the end of the intestine stage by the ABTS radical inhibitor method with whey protein concentrate (CPS) were (10.79 ± 0.85 $\mu\text{mol TE} / \text{g protein}$), hydrolyzed permeate of Alcalase + Neutrase (A + N) (18.02 $\mu\text{mol TE} / \text{g protein}$); FRAP with CPS (1.4 $\mu\text{mol TE} / \text{g protein}$), A + N (5.16 $\mu\text{mol TE} / \text{g protein}$); Anti-HOCl method with CPS (34.91 ± 0.085 $\mu\text{mol of AC} / \text{g of protein}$) A + N (38.72 $\mu\text{mol of AC} / \text{mg of protein}$), Anti- α -Amylase with CPS IC 50 (0.086 ± 0.007 $\text{g of protein} / \text{ml}$), A + N IC 50 (0.063 ± 0.0039 $\text{g protein} / \text{ml}$). The results of the combination of enzymes, combined with ultrafiltration, decreased the molecular weight and improved the bioavailability, contributing to the development of peptides with greater functional capacity in relation to the integral protein after digestion. The molecular profile showed a decrease in proteins of molecular weight from 100 to 250 kDa after Ultrafiltration, proving that UF is a suitable method for the purification of low molecular weight peptides, with exclusive peptides <10kDa being found. Thus, bioactivity can be improved with digestion combined with hydrolysis and ultrafiltration, especially rapid change occurs when pancreatic enzymes are added. Bioactivities such as the anti-inflammatory, anti-diabetic and antioxidant action are related to the peptides released by the action of pancreatic enzymes, observing a rapid increase after the addition of these enzymes. Although there are no significant differences in the anti-inflammatory action of the peptides after digestion, an improvement was observed in relation to the integral protein. Digestion alters the peptide profile, the results suggest a strong application potential of the peptides as an ingredient of food enrichment, functional food and supplementation with the purpose of Antioxidant, Anti-inflammatory and Antidiabetic action.

Keywords: Biopeptides. Biological activity. Hydrolyzed whey protein. Gastrointestinal digestion

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fluxograma da metodologia deste estudo.....	20
Figura 2 - Mapa temático gerado no bibliometrix a partir de artigos encontrados no Scopus com os termos “whey protein” AND “hydrolysate” AND “bioactivity peptides”	22
Figura 3 - Hidrólise de ligações peptídicas em pH ácido (2) e alcalino (8)	24
Figura 4 - Espécies reativas de oxigênio	29
Figura 5 - Nuvem de palavras gerada no bibliometrix, resultado das 50 palavras-chave mais citadas na literatura a partir de artigos encontrados no Scopus com os termos “whey protein” AND “hydrolysate” AND “bioactivity peptides”.	34
Figura 6 - Características de processos que utilizam diferença de pressão como força motriz.....	38
Figura 7: Fluxograma geral dos processos utilizados neste trabalho.	47
Figura 8 - Esquema do Biorreator utilizado para a hidrólise proteica do CPS e separação dos peptídeos.....	52
Figura 9 - Cinético do grau de hidrólise das proteínas do soro de leite.....	60
Figura 10 - Cinética do Grau de hidrólise das proteínas do CPS produto de hidrólise sequencial pelas enzimas Alcalase e Neutrase	61
Figura 11 - Caracterização fluxo do permeado com soluto água miliQ	63
Figura 12 - Fluxo permeado através da membrana de UF operando com solução proteica hidrolisada pelas enzimas Alcalase e Neutrase a 1 bar de pressão e 100°C de temperatura	64
Figura 13 - Caracterização molecular de biopeptídeos do CPS obtidos por hidrólise sequencial Alcalase + Neutrase.	66
Figura 14 - (A) Perfil eletroforético das proteínas padrão (10-250 kDa) e do CPS Intacta em gel Tris-Tricina; (B)Perfil eletroforético Peptídeos do CPS Intacta pós digestão e Hidrolisados A+N permeado pós digestão em gel Tris-Tricina.....	69
Figura 15 - (A) Perfil eletroforético dos marcadores padrão (10-250 kDa) e do CPS hidrolisado em gel Tris-Tricina; (B) Perfil eletroforético peptídeos após ultrafiltração em gel Tris-Tricina.	70
Figura 16 - Atividade Antioxidante ABTS após digestão do soro de leite concentrado e permeado de peptídeos obtidos pela hidrólise Alcalase+Neutrase.....	74

Figura 18 - Atividade Anti HOCl após digestão do soro de leite concentrado e permeado de peptídeos obtidos pela hidrólise Alcalse+Neutrased.....	78
Figura 19 - Atividade Anti α -amilase pós- digestão do soro de leite concentrado e permeado de peptídeos obtidos pela hidrólise Alcalse+Neutrased.....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração de proteínas do soro de leite.....	17
Tabela 2 - Matriz alimentar, a sequência de aminoácido e separação/caracterização da atividade biológica obtida.....	23
Tabela 3 - Enzimas, condições e inativação de hidrólise utilizadas	44
Tabela 4 - Caracterização físico-química.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α - Alfa

AC - Ácido ascórbico

ALC - Alcalase

A+N - Alcalase + Neutrase

ATP - Adenosina tri-fosfato

β - Beta

BSA- Soro Albumina Bovina

CMC - Comprimento médio da cadeia

CPS - Concentrado proteico do soro de leite

Da - Daltons

DPP-IV - Dipeptil peptidase IV

ECA - Enzima conversora de angiotensina

FTIR - Espectroscopia no infravermelho próximo

g - Grama

GH - Grau de hidrólise

H - Horas

HOCl - Ácido hipocloroso

Ig- Imunoglobulinas

IL- Interleucina

L - litros

LA -Lactoalbumina

LG - LACTOGLOBULINA

LF- Lactoferrina

MF - Microfiltração

mL - Mililitro

Min - Minutos

MMM - Massa molecular média

N - Neutrase

NF - Nanofiltração

ORAC - radical oxigênio

OI - Osmose Inversa

SGF - Fluido de suco gástrico

SIF - Fluido de suco intestinal

SOR - Radical Superóxido

TE - Trolox equivalente

UF - Ultrafiltração

SUMÁRIO

1	CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO	16
2	CAPÍTULO 2 – ANÁLISE DE OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS DO SORO DE LEITE.....	18
2.1	INTRODUÇÃO.....	18
2.2	METODOLOGIA DA PESQUISA.....	19
2.3	SORO DE LEITE	20
2.3.1	Hidrólise de proteínas do soro de leite	23
2.3.2	Atividade biológica de peptídeos do soro do leite	27
2.3.3	Bioatividade de origem oxidativa	28
2.3.4	Outras bioatividades	33
2.3.5	Digestão gastrointestinal	35
2.3.6	Métodos tradicionais de separação e caracterização de peptídeos.....	37
2.4	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	42
3	CAPÍTULO 3 – BIOATIVIDADE DE PEPTÍDEOS DO SORO DE LEITE OBTIDOS POR HIDRÓLISE E ULTRAFILTRAÇÃO EM CONDIÇÕES GASTROINTESTINAL SIMULADAS.....	44
3.1	INTRODUÇÃO.....	44
3.2	MATERIAL E MÉTODOS	46
3.2.1	Hidrólise do CPS	47
3.2.2	Grau de Hidrólise (pH-Stat)	48
3.2.3	Cálculo do comprimento médio da cadeia e da massa molecular média dos peptídeos	50
3.2.4	Ultrafiltração (UF).....	51
3.2.5	Caracterização inicial da membrana	51
3.2.6	Ultrafiltração do concentrado proteico hidrolisado.....	51
3.2.7	Simulador estático de digestão gastrointestinal	52
3.2.8	Digestão simulada do esôfago e estômago.....	53
3.2.9	Caracterização da matéria-prima e dos produtos obtidos.....	54
3.2.10	Eletroforese em gel	54
3.2.11	Atividades Biológicas	55

3.2.12	Atividade Antioxidante.....	55
3.2.13	Método ABTS.....	55
3.2.14	Método FRAP.....	56
3.2.15	Atividade anti-inflamatória.....	57
3.2.16	Atividade antidiabética (inibição da α -amylase).....	57
3.2.17	Análise estatística dos resultados.....	58
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
3.3.1	Caracterização físico-química do CPS.....	58
3.3.2	Cinética enzimática do produto de hidrólise para produção de biopeptídeos.....	59
3.3.3	Ultrafiltração dos hidrolisados proteicos de soro de leite.....	62
3.3.4	Caracterização físico-química e molecular dos peptídeos do soro de leite.....	65
3.3.5	Atividade biológica de peptídeos do soro de leite.....	71
3.4	CONCLUSÃO.....	83
4.	CONCLUSÃO GERAL.....	86
	REFERÊNCIAS.....	86

1 CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

O soro de leite é um subproduto proteico obtido pela produção de queijo. Existem vários processos que auxiliam na obtenção de produtos com alto teor de proteínas nativas a partir do soro: os concentrados e os isolados de proteínas do soro, geralmente por filtração com membranas (PINTO, 2008). No entanto, a transformação do soro de leite em concentrado proteico ou isolado gera um grande fluxo de permeado contendo lactose e sais, que necessita de um processo posterior para uso ou para descarte (YADAV et al. 2015). Isto faz acreditar que o reaproveitamento do soro para um único produto não é muito rentável.

Além disso, as proteínas isoladas podem ainda ser valorizadas através de hidrólise enzimática para obtenção de frações de peptídeos não alergênicos e peptídeos com atividade biológica específica, além do seu valor nutritivo (BU et al., 2020). As proteínas em geral, podem ter peptídeos criptografados na sua estrutura, que por processo de hidrólise ou digestão são liberados, absorvidos e transportados para os órgãos, atuando em diversas vias metabólicas específicas e fornecendo diversos benefícios diretos à saúde (CICCAGLIONE et al., 2019; OZÓRIO et al., 2020; LI et al., 2019) sendo assim conhecidos também como biopeptídeos.

A função biológica dos peptídeos está relacionada com o tamanho molecular e sequência específica de aminoácidos (SARMADIA; ISMAIL, 2010). Os pesquisadores contam com diversas técnicas que auxiliam na separação como filtração por membranas (O'KEEFFE et al., 2017), a determinação da sequência de peptídeos por espectrometria de massa (CONTRERAS et al., 2008; MAMONE et al., 2009) além de métodos eletroforéticos que auxiliam na separação molecular (CORROCHANO et al., 2019).

Dentre as biofuncionalidades dos peptídeos destaca-se sua ação anti-inflamatória (LI et al., 2019), proteção contra inflamação intestinal crônica, desregulação da ingestão de alimentos, predisposição para hipertensão e diabetes tipo II (ARROUME et al., 2016) além de atividade antioxidante (ADEFEGHA et al., 2016; AYYASH et al., 2018) antibacteriana (CICCAGLIONE et al., 2019) e imunomoduladora (MOHAMED et al., 2018).

Os alimentos derivados do soro do leite, ao ser ingeridos via oral são submetidos ao processo de digestão, havendo ação química, física ou enzimática no sistema gastrointestinal sobre as estruturas proteicas (SANCHÓN et al., 2018), que podem alterar a biofuncionalidade dos peptídeos. Hidrolisados proteicos contendo principalmente di e tri-peptídeos são absorvidos mais rapidamente do que uma mistura equivalente de aminoácidos livres e

proteínas intactas, maximizando a liberação de nutrientes para o corpo (BRANDELLI et al., 2015).

Sendo assim, compreender a bioacessibilidade de peptídeos é de extrema importância a fim de desenvolver um alimento funcional estável, depois de submetido à digestão. A realização de testes em humanos além de ser cara e encontra dificuldade em aprovação ética, neste sentido, os modelos *in vitro* substituem artificialmente as condições do sistema digestivo durante a digestão. Os modelos estáticos de digestão gastrointestinal simulada *in vitro* se aproximam muito das condições *in vivo*, permitindo uma boa triagem para compreensão da bioacessibilidade de alimentos e produtos farmacêuticos como os peptídeos (SANCHÓN et al., 2018). As condições de hidrólise do sistema biológico durante a digestão, muitas vezes não é o suficiente para fornecer a bioatividade. Hidrolisar as proteínas previamente aumenta a bioatividade se realizada de forma controlada. Durante o trânsito intestinal, as enzimas hidrolíticas auxiliam a diminuir o tamanho molecular dos peptídeos em cinergismo com o tratamento prévio enzimático, realizado com as enzimas comerciais. A combinação resulta em peptídeos de baixo peso molecular <1 kDa e expor os grupos hidrofóbicos, fator primordial para obter peptídeos com multifuncionalidade.

O estudo de biopeptídeos obtidos por hidrólise e ultrafiltração já tem um histórico no Laboratório de Operações Unitárias da UPF. Teve início com a dissertação de biopeptídeos do soro de leite da Kátia Verdi em 2017, biopeptídeos do butter milk da Sandrini Slongo em 2020, minha dissertação de avaliação de peptídeos pós simulação gástrica em 2021 e atualmente ainda continua com a tese de doutorado do Alessandro Sbeghen, com produção de biopeptídeos obtidos de carne mecanicamente separada. O objetivo do trabalho foi desenvolver conhecimento teórico metodológico sobre a bioacessibilidade de peptídeos do soro de leite após simulação estática gastrointestinal *in vitro* como triagem para construção de novas hipóteses de bioacessibilidade e avaliar a atividade biológica. Os objetivos específicos foram: a) Avaliar sistematicamente a publicação em periódicos sobre o tema hidrólise e digestão; b) Avaliar a hidrólise para a produção de peptídeos a partir de proteínas do soro de leite; c) Separar e fracionar os biopeptídeos por ultrafiltração, avaliando suas atividades biológicas (antioxidante, anti-inflamatória e antidiabética); d) Caracterizar a estabilidade dos biopeptídeos e avaliar suas atividades bioativas após simulação gastrointestinal.

2 CAPÍTULO 2 – ANÁLISE DE OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS DO SORO DE LEITE

Este capítulo apresenta um artigo de revisão sistemática a ser submetido para uma revista científica.

2.1 INTRODUÇÃO

O soro de leite é um subproduto proteico obtido pela coagulação das caseínas no processo de produção de queijo. As proteínas nativas do soro tem alto valor nutricional (PINTO, 2008) e possuem ótima capacidade funcional (CORROCHANO et al, 2019). Em geral, as proteínas podem ter peptídeos criptografados na sua estrutura, que por processo de hidrólise ou digestão são liberados, absorvidos e transportados para os órgãos, atuando em diversas vias metabólicas específicas e fornecendo diversos benefícios diretos à saúde (CICCAGLIONE et al., 2019; OZÓRIO et al., 2020; LI et al., 2019) sendo assim conhecidos também como biopeptídeos.

O tamanho molecular e sequencia específica de aminoácidos, são importantes na atividade biológica dos peptídeos (SARMADIA; ISMAIL, 2010). Em destaque, os peptídeos podem apresentar atividade anti-inflamatória (LI et al., 2019), proteção contra inflamação intestinal crônica, desregulação da ingestão de alimentos, predisposição para hipertensão, diabetes tipo II (ARROUME et al., 2016) atividade antioxidante (ADEFEGHA et al., 2016; AYYASH et al., 2018) antibacteriano (CICCAGLIONE et al., 2019) e imunomoduladora (MOHAMED et al., 2018).

Os pesquisadores se inovam, reiventam para melhorar as condições em produzir peptídeos a baixo custo, além de desenvolver métodos para produção em escala industrial. Existem diversas técnicas que auxiliam na separação/concentração de peptídeos como filtração por membranas (O'KEEFFE et al., 2017). E os desafios continuam, torna-se essencial compreender a ação e mecanismo dos peptídeos no organismo. Os bancos de dados compartilhados facilitam a análise a partir de informações registradas pelo pesquisados após determinar a sequência de peptídeos e aminoácidos, usando, por exemplo, espectrometria de massa (CONTRERAS et al., 2008; MAMONE et al., 2009) e auxilio de métodos eletroforeticos, que separam os peptídeos por peso molecular (CORROCHANO et al., 2019).

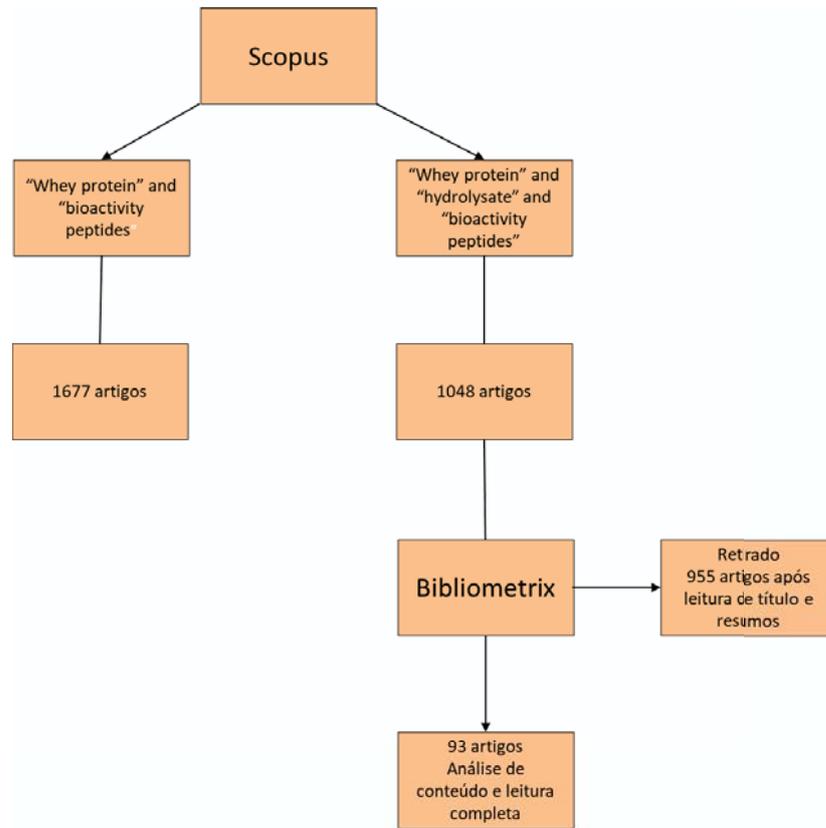
Os produtos do soro de leite quando ingeridos via oral são submetidos ao processo de digestão, sofrendo sobre as estruturas proteica ação química, física ou enzimática no sistema gastrointestinal (SANCHÓN et al., 2018), que podem alterar a biofuncionalidade dos peptídeos. Compreender a bioacessibilidade de peptídeos, permet0065 desenvolver um alimento funcional estável, depois de submetido à digestão. Os modelos *in vivo* ou humanos, exigem recursos e encontram dificuldade em aprovação ética, por isso os modelos *in vitro* substituem artificialmente as condições do sistema digestivo durante a digestão. Além de que os modelos estáticos de digestão gastrointestinal simulada *in vitro* se aproximam muito das condições *in vivo*, indeferindo uma boa triagem para compreensão da bioacessibilidade de alimentos e produtos farmacêuticos como os peptídeos (SANCHÓN et al., 2018).

As condições de hidrólise controlada se obtem de peptídeos de baixo peso molecular que conseguem passar a barreira gastrointestinal e manter sua bioatividade. Essas questões têm sido base de estudos emergentes para avaliar a bioacessibilidade após digestão, impulsionados por consumidores cada vez mais experientes e exigentes, com facilidade de acesso a informações que tenham embasamento científico. Com isso, o presente estudo teve como objetivo principal realizar uma revisão bibliométrica e sistemática das etapas de produção de peptídeos do soro do leite, avaliando os tópicos mais relevantes nesse contexto, abordando as principais perspectivas e desafios da produção de peptídeos funcionais até sua entrega no organismo.

2.2 METODOLOGIA DA PESQUISA

Inicialmente foi realizada uma pesquisa geral dos últimos 5 anos com os seguintes descritores a) “whey protein” and “bioactivity peptides”; na base de dados Scopus, considerada umas melhores bases de dados de documentos científicos, com estudos de alta qualidade (SEABRA; CALDEIRA-PIRES, 2020) e abrangência do tema proposto. Essa pesquisa foi realizada para analisar de forma geral o tema, após foi realizado a busca com os termos b) “whey protein” and “hydrolysate” and “bioactivity peptides”, para análise dos principais tópicos discutidos na literatura e aplicar posteriormente análise bibliométrica. Para isso, os artigos foram exportados no formato Bibliometrix baseado no resultado geral Figura 1, posteriormente feito análise no software RStudio versão 3.6.1 (ARIA; CUCCURULLO, 2017).

Figura 1 - Fluxograma da metodologia deste estudo



Fonte: elaborado pelo Autor, (2020).

Após análise dos artigos, foram retidos da busca 955 artigos pelos seguintes critérios de exclusão: não se enquadrava no tema, matriz proteica não láctea ou por leitura do resumo não se enquadrava ao tema. As 50 palavras mais incidentes entre título, palavras-chave e resumo entre todos os artigos encontrados foram separadas e avaliadas. Como resultados mapas temáticos foram criados a partir da análise e agrupamento de redes de palavras (COBO et al., 2011). A Tabela 2 apresenta os principais produtos obtidos por hidrólise do soro do leite, técnicas de separação, caracterização da sequência de aminoácidos e seus alvos biológicos específicos. As considerações finais foram sintetizadas na opinião crítica dos autores, a fim de contribuir com a abordagem apresentada e as perspectivas futuras sobre produção de biopeptídeos a partir de hidrólise do soro do leite.

2.3 SORO DE LEITE

O soro de leite tem proteínas de alto valor biológico, a Tabela 1 resume a composição de proteínas encontrada na literatura para o soro de leite bovino. A concentração de proteínas depende da forma como o soro foi obtido (ácido ou doce), da espécie animal, (bovino, caprino ou ovino), nutrição animal, época do ano, estágio de lactação de o processamento realizado. As cadeias polipeptídicas podem ter alto peso molecular, forma globular com conteúdo α -hélice (MOLLEA; MARMO; BOSCO, 2013).

Tabela 1. Concentração das proteínas do soro de leite e respectiva massa molar

Proteína	% Proteína no soro de Leite	Peso Molecular (kDa)
β -Lactoglobulina (β -LG)	50-60	18
α -Lactoalbumina (α -LA)	15-25	14
Imunoglobulinas (IgG)	>10	150
Soro Albumina Bovina (BSA)	6	66
Lactoferrina (LF)	3	78

Fonte: MOLLEA; MARMO; BOSCO, (2013) Adaptado por CORROCHANO_b et al., (2018).

O soro de leite é um produto rico em proteínas produzidos em grande volume todos os anos, segundo dados da FAO, (2021), em 2018 foram produzidos 19,3 milhões de toneladas Queijo do leite de vaca integral e de leite desnatado 2.5 milhões, se considerarmos que para cada 1 Kg de queijo são liberados 10 L de soro, (ZOTTA et al., 2020), cerca de 210 milhões de toneladas de soro de leite de vaca são produzidas anualmente. Ainda segundo FAO (2021), em 2018 foram produzidos apenas cerca de 2,8 milhões de toneladas de soro de leite seco (em pó) e 471 mil toneladas de soro de leite condensado.

Além das proteínas, encontra-se na composição do soro gorduras, lactose, vitaminas e minerais. Devido à alta quantidade de matéria orgânica e grande volume produzido, o soro de leite é um composto orgânico com capacidade como poluente ambiental da indústria de laticínios. A degradação no ambiente é dificultada pela alta demanda bioquímica de oxigênio (BACENETTI et al., 2018). O soro de leite deixou de ser considerado um resíduo e passou a ser tratado como subproduto, onde diversas técnicas forma desenvolvidas para valorizar o soro de leite, mas mesmo assim ainda existe uma grande quantidade sendo descartada (ZOTTA et al., 2020),

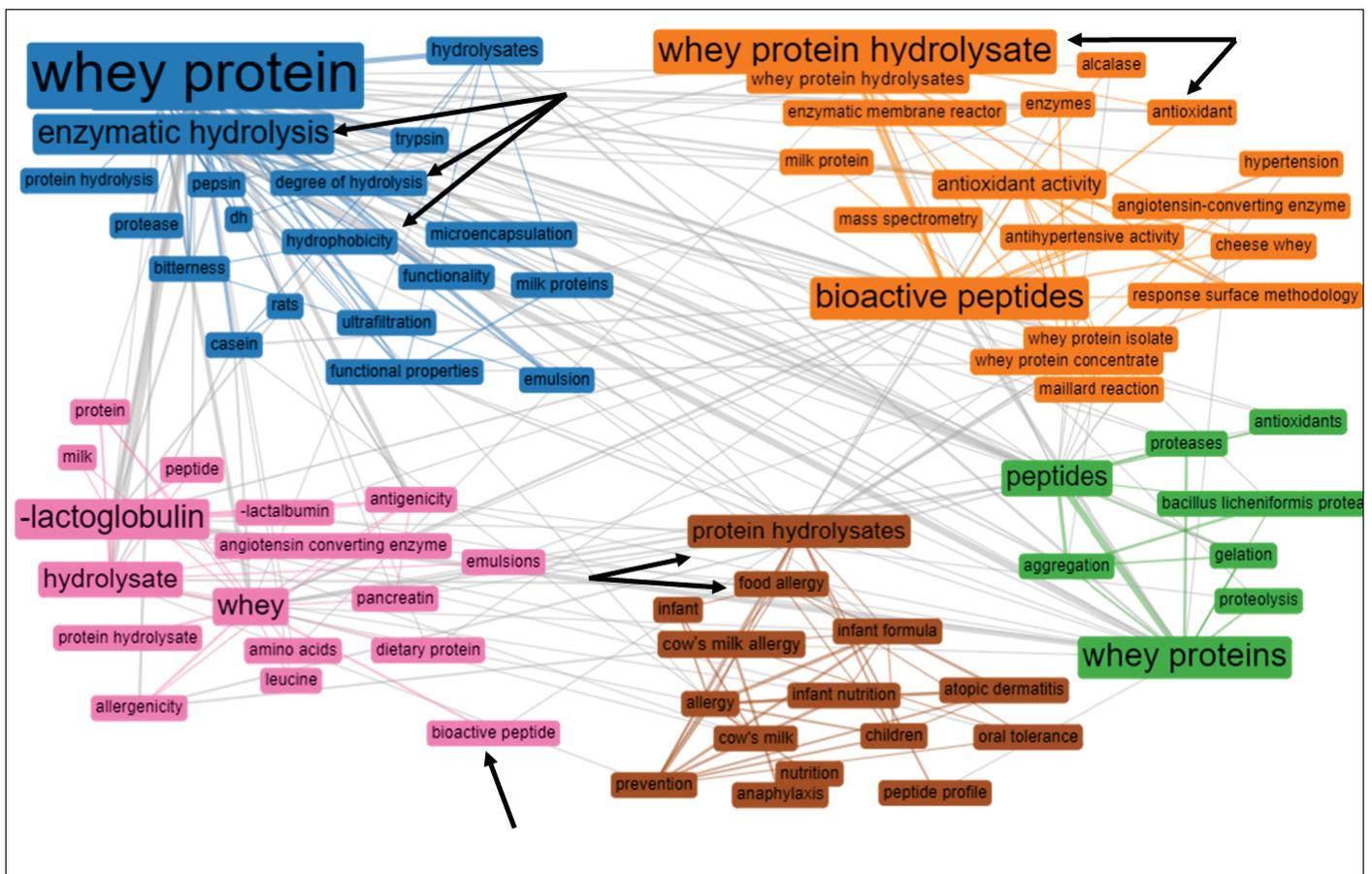
Como alternativa de valorizar o soro de leite, emerge a produção de peptídeos com propriedades funcionais. Os peptídeos são liberados por processo de hidrólise das proteínas

nativas do soro, expondo grupos químicos específicos antes presos a estrutura proteica, exercendo efeito sobre a saúde (CICCAGLIONE et al., 2019; LI et al., 2019).

A produção de peptídeos é largamente estudada por hidrólise de proteínas com enzimas digestivas (CORROCHANO^a et al., 2018; BU et al., 2020), mas existem outras rotas como a fermentação microbiana (TOLDRÁ et al., 2018) e hidrólise enzimática com enzimas comerciais (CORROCHANO et al., 2019).

Para revelar mais informações sobre os estudos sobre a produção de peptídeos do soro de leite, foi utilizada a análise bibliométrica. A Figura 2 apresenta o resultado das 76 palavras-chave mais citadas na literatura com referência em *cluster*, a partir de artigos encontrados na base de dados Scopus da busca com os termos “whey protein” and “hydrolysate” and “bioactivity peptides”, mostrando o mapa temático gerado no bibliometrix.

Figura 2 - Mapa temático gerado no bibliometrix a partir de artigos encontrados no Scopus com os termos “whey protein” AND “hydrolysate” AND “bioactivity peptides”



* A pesquisa realizada no banco de dados da Scopus compreendeu um total de 1048 publicações

Fonte: elaborado pelo Autor, 2020

No mapa temático apresentado na Figura 2, destacamos os termos relacionados a peptídeos bioativos como: soro de leite hidrolisado, hidrólise enzimática, grau de hidrólise, peptídeo bioativo, antioxidante, alergenicidade e hidrofobicidade. Pode-se verificar que a hidrólise de proteínas está relacionada à produção de peptídeos bioativos e diminuição de alergenicidade (BU et al., 2020). As propriedades estruturais de peptídeos pelo grau de hidrólise e hidrofobicidade determinam o resultado de um peptídeo com ação bioativa (SARMADIA; ISMAIL, 2010) e continua atual em pesquisas, pois o termos estão entre os mais citados nas publicações indexados na Scopus avaliado os últimos 5 anos. O alto grau de hidrólise melhora o efeito antioxidante de peptídeos, o estresse oxidativo celular é patogênese de diversas doenças metabólicas, sendo assim o interesse em peptídeos com atividade com ação antioxidante tem ganhado destaque (MOHAMED et al., 2018; WANG et al., 2016)

2.3.1 Hidrólise de proteínas do soro de leite

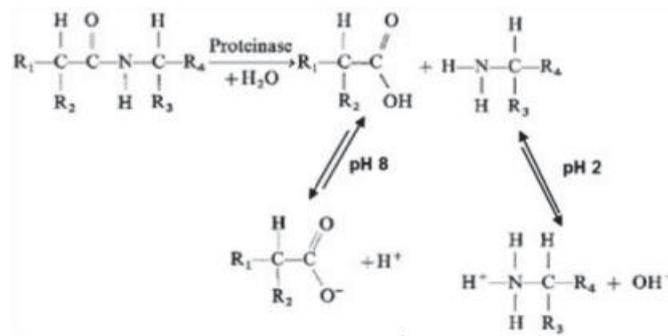
Os peptídeos exercem o seu efeito no nível da proteína inibindo enzimas metabólicas, influenciando mudanças conformacionais, regulando genes diretamente ou interagindo com reguladores transcricionais. Da mesma forma, podem interagir diretamente e remover os metabólitos, ajudando a manter a homeostase (UDENIGWE, 2014). Eles compartilham características estruturais com peptídeos endógenos do organismo que funcionam como hormônios, neurotransmissores ou peptídeos reguladores e, portanto, podem interagir com os mesmos receptores e atribuir funções além da nutrição básica (LI-CHAN, 2015). Além dos peptídeos do soro de leite, existe um grande incentivo em pesquisas para produzir peptídeos de outras fontes proteicas. Em 1981, houve uma revolução no mercado de peptídeos com a aplicação da Insulina humana recombinante (Humulin®, Genentech, EUA) na terapia de diabetes (LOPES et al., 2015). Vários peptídeos já foram aprovados pelo Food and Drug Administration (FDA) e cerca de 500 peptídeos estão em desenvolvimento clínico (FOSGERAU; HOFFMANN, 2015).

O processo de hidrólise de proteínas, além de melhorar a bioatividade colabora com a diminuição de alergia às proteínas. Algumas pessoas não conseguem digerir a proteína intacta, na sua forma nativa o que pode causar uma reação alérgica, como nos casos de bebês com alergia ao leite e fenilcetonúricos. A fenilcetonúria uma desordem metabólica genética caracterizada pela deficiência da enzima fenilalanina hidrolase, responsável pela conversão de fenilalanina em tirosina. É uma doença rara que não tem cura e cujo tratamento consiste

basicamente em seguir uma dieta isenta de fenilalanina. Os hidrolisados de proteínas de soro de leite com alto grau de hidrólise reduz níveis de fenilalanina, sendo empregados como alternativa para formulações (BU et al., 2020).

O Grau de Hidrólise refere-se à porcentagem de ligações peptídicas clivadas durante o processo de hidrólise. A hidrólise de proteínas, em outras palavras é uma adição de molécula de água na ligação peptídica que resulta na partição para liberar um grupamento de ácido carboxílico (C-terminal) e um grupo amino (N-terminal) (CHEISON; KULOZIK, 2017) conforme a Figura 3.

Figura 3 - Esquema de hidrólise de ligações peptídicas em pH ácido (2) e alcalino (8)



Fonte: CHEISON; KULOZIK, (2017)

A hidrólise em pH ácido libera grupos OH^- Figura 3, já a hidrólise em pH básico libera H^+ . Portanto a hidrólise em pH ácido aumenta o pH do meio e hidrólise em pH básico diminui o pH do meio. As enzimas tem o pH ótimo de trabalho, e a reação é controlada com HCl ou NaOH. Assim, quando há correlação linear com o grau de hidrólise, o número de ligações peptídicas clivadas pode ser estimado pelo método pH-stat de acordo com a Equação 1 (ADLER-NISSEN, 1986).

$$\text{GH} = \frac{(h)}{(\text{H}_{\text{tot}})} \times 100 \quad (1)$$

sendo:

GH: grau de hidrólise

h: Número total de ligações peptídicas antes da reação;

H_{tot} : número máximo de ligações peptídicas em uma proteína (dado em mequivalentes / proteína g)

Assim, quando há correlação linear com o grau de hidrólise em meio alcalino, o número de ligações peptídicas clivadas pode ser estimado pelo método pH-stat calculando a quantidade de base de forma contínua, requerida para manter o pH controlado durante a modificação da Equação 1 pela Equação 2 de acordo com ADLER-NISSEN, (1986).

$$GH = VB * N * \frac{1}{M_p} * \frac{1}{h_{tot}} * \frac{1}{\alpha} * 100 \quad (2)$$

GH: grau de hidrólise

VB: Volume de base consumida durante a hidrólise para manter o pH constante (mL);

N: Normalidade da base;

M_p: Massa de proteína (g);

α: Grau de dissociação;

h: Número total de ligações peptídicas antes da reação;

8mol equivalente/kg de proteína;

Para o Grau de dissociação, Equação 3:

$$\alpha = \frac{1}{(1+10^{pK-pH})} \quad (3)$$

sendo:

α: Grau de dissociação;

pK: Varia de acordo com a temperatura da reação;

pH: Constante;

Para o pK, Equação 4:

$$pK = 7,8 + \frac{(298-T)}{(298 \times T)} \times 2400 \quad (4)$$

sendo:

T: Temperatura em Kelvin

Em condições do pH do meio ácido, o volume adicionado de HCl pode ser correlacionado com o grau de hidrólise pelo método pH-stat. O grupo específico liberado por

alterar o pH do meio é o ácido carboxílico e a ionização dos íons OH^- , calculado pela modificação da Equação 2 pela Equação 5 de acordo com Diermayr e Dehne (1990).

$$\text{GH} = \frac{F_{\text{pH}} \cdot V_{\text{HCl}} \cdot N_{\text{HCl}}}{\text{MP} \cdot h_{\text{tot}}} * 100 \quad (5)$$

GH: grau de hidrólise

F_{pH} : é um fator de correção e é influenciado pelo valor de pH entre 25° C e 50° C

V_{HCl} : Volume de HCL consumida durante a hidrólise para manter o pH constante (mL);

N_{HCl} : Normalidade do HCl;

M_p : Massa de proteína (g);

h_{tot} : número máximo de ligações peptídicas em uma proteína (dado em mequivalentes / proteína g)

De acordo com o grau de hidrólise alcançado, diferentes peptídeos são formados com variações nas massas molares e na sua funcionalidade (CICCAGLIONE et al, 2019; OZÓRIO et al, 2020; LI et al., 2019). De acordo com Parkin; Damodaran; Fennema, (2010), para GH entre 3 e 6%, peptídeos de tamanho médio de 2 a 5 kDa são formados, e são desejáveis para a funcionalidade física do hidrolisado. Para GH próximo de 8% forma-se peptídeos de tamanho médio entre 1 a 2 kDa, com ótima solubilidade e indicado para uso em nutrição clínica e esportiva. Um GH entre 50 a 70% gera pequenos peptídeos e aminoácidos, menores que 1 kDa em média, utilizados na formulação de alimentos infantis hipoalergênicos e como ingredientes saborizantes para sopas e molhos. Em GH superior a 70% observa-se acúmulo de peptídeos amargos devido ao tamanho reduzido e a hidrofobicidade. Durante processos de hidrólise o grau de hidrólise deve ser monitorado de acordo com a faixa de pesos molecular pretendida e também para evitar perdas sensoriais.

O principal desafio para obter um grau de hidrólise elevado é romper as estruturas secundárias das proteínas, como as α -hélice é menos susceptível a proteólise. Condições como o pré-tratamento utilizando a temperatura, alta pressão, solvente, pH (CHEISON; KULOZIK, 2017) e ultrassom (LORENZETTI et al, 2020), é fundamental para a desnaturação da proteína o desdobramento α -hélices para folhas β ou bobinas aleatórias, facilitando o acesso de enzima no sítio de clivagem (CHEISON; KULOZIK, 2017; RIERA, 2013).

Com o avanço do grau de hidrólise, as mudanças estruturais podem alterar as características sensoriais. Se considerarmos os 4 principais atributos gustativos (amargor, adstringência, umami e salinidade), os biopeptídeos com peso molecular abaixo entre <500-1000, tendem a apresentar apresentar sabor amargo) LEKSRI SOMPONG ET al. (2010). Avaliando hidrolisados e proteína intacta do soro de leite por uma língua eletrônica, (BU et al, 2020), observaram intensidades do gosto após hidrólise como aumento do sabor amargor e diminuição do umami, a adstringência e salinidade da proteína do soro do leite intacto ficaram abaixo de zero, enquanto esses dois valores aumentaram significativamente após a hidrólise.

2.3.2 Atividade biológica de peptídeos do soro do leite

Reforçando os resultados do mapeamento bibliométrico, a Tabela 2 foi desenvolvida. Foram analisados os principais métodos analíticos de concentração, purificação e caracterização desses peptídeos. É comprovado por esta, possibilidades de obter multifuncionalidades a partir do soro de leite por hidrólise de frações proteicas e utilizando diferentes enzimas ou combinações de enzimas (YADAV et al., 2016, O'KEEFFE et al., 2017)

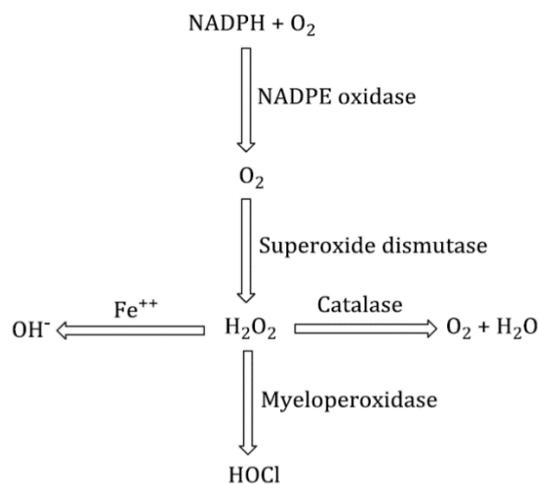
Tabela 2: Matriz alimentar, a sequência de aminoácido e separação/caracterização da atividade biológica obtida.

Substrato	Enzima	Sequência aminoácidos	de	Método de caracterização/separação	Bioatividade	Referência
β -LG bovina	Corolase® PP	MAA VAGT		UF 5kDa/ RP-HPLC / UPLC - ESI - MS / MS	Inibição da ECA	O'KEEFFE et al., (2017)
Soro de leite	Kluyveromyces marxianus /sacharomyces cerevisiae	ND		Eletofórese em gel SDS-PAGE / UF 10kDa e 1kDa	Redução de ácido nucleico	YADAV et al., (2016)
β -LG bovina	Trypsin	V ₁₅ AGTW ₂₀ Y		UF 1 kDa, 5 kDa e 2 kDa/ RP-HPLC- MS	Antioxidante	POWER, et al., (2014)
β -caseína / α S1 - caseína	Corolase® PP	MPI		UF 5kDa/ RP-HPLC/ UPLC-ESI-MS / MS	Antioxidante	O'KEEFFE et al., (2017)
Soro de leite	Subtilisinas	PEGDLEI VEELKPT VEELKPTPE TPEVDDEALEK		UF centrífuga 3kDa/ LC-MS / MS	Antioxidante	MANN et al., (2015)
β -LG	Subtilisinas	GTWYSL LSFNPTQL MAASDISLL AMAASDISLL DTDYKKYLLF IIAEKTKIPAVF DIQKVAGTWYSL ELKPTPEGDLEIL		Eletofórese/LC - MS / MS	Anti-inflamatória	BAMDAD et al., (2017)
Soro de leite Isolado	DIG	N.D.		UPLC / ESI-HR-MS / MS	Inibição DPP-IV	CORROCHAN O et al., (2018)
β -LG	Subtilisinas	GTWYSL LSFNPTQL MAASDISLL AMAASDISLL DTDYKKYLLF IIAEKTKIPAVF DIQKVAGTWYSL ELKPTPEGDLEIL		Eletofórese/LC - MS / MS	Inibição DPP-IV	BAMDAD et al., (2017)

2.3.3 Bioatividade de origem oxidativa

A atividade antioxidante de peptídeos é largamente estudada, sabe-se que com a diminuição do peso molecular ocorre aumento da atividade antioxidante. Derivado da análise bibliométrica, a atividade antioxidante aparece entre os 50 termos mais citados em publicações. O efeito danoso causado pelo estresse oxidativo impulsiona o desenvolvimento de peptídeos antioxidantes (GALLEGO et al., 2020; TIAN et al., 2015; FITZGERALD et al., 2020). É conhecido que o oxigênio molecular é vital nos processos aeróbicos, já o oxigênio inalado pode ser convertido em espécies reativas de oxigênio. As espécies reativas de oxigênio mais populares são a radical hidroxila (OH^-), o anion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o ácido hipocloroso (HOCl). A Figura 4 resume o metabolismo das espécies reativas de oxigênio (HARE et al., 2018).

Figura 4 - Espécies reativas de oxigênio



Fonte: HARE; BEIGI; TZIOMALOS, (2018).

As espécies reativas de oxigênio apresentadas na Figura 4, vêm da via do metabolismo celular de carboidratos para produção de “energia” em forma de Adenosina trifosfato (ATP) (OYEDEMI, et al. 2017). Os sistemas celulares tem a capacidade de eliminar os radicais livres por meio da ação de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase, catalase e a glutathiona peroxidase. O desequilíbrio dessas espécies reativas leva ao estresse oxidativo celular (IGHODARO, 2018; MCGARRY et al., 2018; SCICCHITANO et al., 2018).

Com isso, os peptídeos têm se mostrado como alternativa em inibir os processos oxidativos celular. A atividade antioxidante de peptídeos gerados através da hidrólise de proteínas está relacionada com a exposição de grupos hidrofóbicos antes inativos na sequência original da proteína intacta (SARMADIA, ISMAIL, 2010), isto explica a maior

atividade antioxidante dos peptídeos em relação à proteína integra, assim como a melhora da atividade antioxidante com o aumento do grau de hidrólise. O alto grau de hidrólise indica que dí e tripeptídeos são formados ao final da reação. A atividade antioxidante desempenhada por tripeptídeos dependem das características eletrônicas e de ligação de hidrogênio dos aminoácidos (FITZGERALD et al. 2020; LI; LI 2013).

O mecanismo de ação das enzimas influencia diretamente na atividade antioxidante. Utilizando a modelagem QSAR para avaliar o mecanismo de ação dos peptídeos Li e Li (2013) observaram que para obter a capacidade antioxidante equivalente ao trolox em hidrolisados é necessário à presença dos aminoácidos C₂ hidrofóbicos com propriedades de baixa ligação eletrônica ou estérica / de hidrogênio, do radical oxigênio (ORAC), em C₄ para o Radical Superóxido (SOR).

O método de avaliar a atividade antioxidante como a captura dos radicais 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) e 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS), em ambos os casos a análise é condizida pela capacidade da amostra em inibir a formação do radical ABTS⁺ e DPPH⁺, pelo mecanismo de transferência de átomos de hidrogênio e transferência de elétrons, sendo este ultimo mais relacionado ao DPPH. O método poder férrico redutor (FRAP) apresenta ação antioxidante através de diversas reações e diminuição da formação de peróxido (GALLEGO et al., 2020). Outro mecanismo antioxidante dos peptídeos é induzir o aumentar nos níveis intracelulares do tripeptídeo glutathione, a atividade antioxidante da glutathione intracelular reduziu a formação de radicais em células HT-29. O tratamento celular com amostras digeridas de β-Lactoglobulina (LG) e α-Lactoalbumina (LA) 0,25 mg/mL reduz os radicais livres e exerce efeito citoprotetor (CORROCHANO et al. 2018). Em contrapartida níveis elevados de espécies reativas de oxigênio podem suprimir o crescimento do tumor e melhorar resistência contra infecção bacteriana. (CELLI et al., 2010). A oxidação por espécies reativas de oxigênio deve ser realizada de forma controlada, necessitando de mais estudos para compreender como deve ser estimulada e quando deve-se inibir.

As espécies reativas são importantíssimas na resposta imune inata, o HOCl (MAITRA et al. 2012), produzido por neutrófilos exerce forte efeito oxidante, citotóxico e atividade bactericida (ERYILMAZ, PALABIYIK, 2013) problema está em níveis elevados de HOCl. Um dos alvos do HOCl são os glóbulos vermelhos, ocorrendo destruição do grupo heme do heme livre, Hb e outras hemoproteínas e, subsequentemente, liberar ferro livre (LU et al., 2015) Níveis altos de Mieloperoxidase, HOCl e acúmulo de ferro estão presentes em algumas doenças como anemia falciforme e aterosclerose (MAITRA et al., 2012; GEBICKA,

BANASIAK, 2012; BAMB, HARAUZ, 2014). O ferro livre pode gerar radicais livres altamente reativos e exerce efeito tóxico, (MAITRA et al 2012; GEBICKA, BANASIAK, 2012; PAPANIKOLAOU, PANTOPOULOS, 2005). A oxidação da proteína C reativa pelo ácido hipocloroso leva ao aumento de agregação plaquetária, via sinalização de ativador plaquetário, que pode piorar um quadro agudo de infarto (BONKLER et al., 2018). Em pacientes com infarto agudo do miocárdio, os Neutrófilos pró-inflamatórios são recrutados para o tecido miocárdio danificado, com o aumento da oxidação pelas mitocôndrias, as mieloperoxidases geram uma forma mais estável e menos tóxica ao neutrófilo, o ácido hipocloroso oxidante (HOCl). O ácido hipocloroso oxida Mioglobina cardíaca após Infarto Agudo do Miocárdio, alterando a sua função no miocárdio afetado, gerando um processo inflamatório (WANG et al., 2016).

Poucos estudos exploram a atividade anti-inflamatória de peptídeos e seus possíveis mecanismos. É conhecido que uma dieta com leite e soro de leite tem efeito anti-inflamatório, como proteção intestinal anti-inflamatória em crianças (DALLAS, et al., 2014; DALLAS, et al., 2013), capacidade de diminuir a inflamação em células 3T3-F442 por Tripeptídeos derivados do leite IPP (Isoleucina-Prolina-Prolina) e VPP (Valina-Prolina-Prolina).

Uma das proteínas do soro de leite, a Lactoferrina é apontada como poderosa no efeito anti-inflamatório. A Lactoferrina tem a capacidade de diminuição nos níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias como as interleucina IL-1 β , IL-6, IL-18, TNF- α , lipocalina, à diminuição de NF κ B a jusante indicadores de sinalização, e estimulação de SOD e expressão de NrF2. NF - κ B, como mencionado anteriormente, é conhecido como regulador transcricional cardinal de respostas inflamatórias mecanismo que tem ação em diminuir a inflamação, além disso, o estudo de Mohamed et al., (2018), provou que a diminuição dos processos inflamatórios auxilia no controle da diabetes. Os danos causados por espécies reativas de oxigênio em células β pancreáticas, altera a cascata de sinalização de insulina, levando a um quadro de resistência à insulina, diminuição de tolerância a glicose e disfunção mitocondrial, principal patogênese do desenvolvimento e progressão do diabetes tipo 2 (hanchang et al 2019 e moussa 2008) diversos estudos relaciona o estresse oxidativo como patogênese da Diabetes Mellitus (SUOMALAINEN; BATTERSBY; 2018; BURGOS-MORON et al, 2019; ROMA JONAS, 2020; ANIGBORO, 2019) e ainda na condição de hiperglicemia crônica, se não for tratada, ocorre aumento de espécies reativas de oxigênio mitocondrial e não mitocondrial (Moussa, 2008).

Todas as células do corpo metabolizam o carboidrato para gerar “energia” na forma de Adenosina Trifosfato (ATP), os desafios na manutenção dos níveis de glicose sanguínea são altíssimos e a situação se complica pelo estresse oxidativo. Em uma condição de Diabetes Mellitus prolongada, as atividades deletérias das espécies reativas são elevadas; portanto, restringindo as atividades desses grupos reativos produziram alguns resultados positivos em pacientes suplementados com peptídeos ao longo do tempo (OYEDEMI, et al. 2017).

A metabolização do carboidrato (açúcares complexos e polissacarídeos) por enzima hidrolases como α -amilase, α -glucosidase, maltase etc, auxilia na liberação de açúcares simples como a glicose, aumentando a absorção rápida de açúcar sérico Anigboro et al, 2018. Portanto os inibidores de α -amilase e α -glucosidase, são uma das opções estudadas atualmente para retardar a absorção de glicose no sangue, principalmente em pacientes diabéticos mellitus tipo 2, após ingestão de alimentos ricos em carboidratos (AVWIOROKO et al., 2020).

Existem poucos estudos que avaliam a atividade inibitória da α -amilase de hidrolisados de proteína do leite. Os estudos realizados indicam que peptídeos de hidrolisados do leite de camelo (MUDGIL, et al, 2018) e leite de camelo por fermentação microbiana leva ao aumento da inibição α -amilase em comparação com as proteínas nativas e intactas do leite (Ayyash, Al-Nuaimi, Al-Mahadin, & Liu, 2018). Comportamento similar foi relado por El et al, (2015), que avaliaram a atividade inibidora de α -amilase dos peptídeos de Kefir e leite de cabra digerido, amostra de leite de cabra digerido IC_{50} ($0,000027 \pm 0,000005$ g de proteína mL^{-1}), kefir digerido IC_{50} ($0,000032 \pm 0,000007$ g de proteína mL^{-1}), leite de cabra IC_{50} ($0,002429 \pm 0,000182$ g de proteína mL^{-1}), Kefir IC_{50} ($0,000139 \pm 0,000012$ g de proteína mL^{-1}).

Outro mecanismo antidiabético pode ser pela inibição da enzima dipeptidil peptidase IV DPP-IV, uma protease ubíqua, secretada e produzida pelas células intestinais e inativa o GLP-1. O mecanismo de inativação do GLP-1 ocorre pela clivagem da prolina N-terminal e alanina. O tratamento com inibidores da DPP-IV é uma opção terapêutica que pode ser alcançada por peptídeos do soro de leite hidrolisado geralmente inibição de 50% da atividade DPP-IV foi observado em concentrações IC_{50} ($0,0015$ e $0,0011$ g de proteína mL^{-1}) (POWER-GRANT et al., 2015).

Os mecanismos antioxidantes podem agir em sinergismo com o efeito metabólico e os multipeptídeos gerados de derivados do soro de leite podem exercer efeito em proteínas e enzimas específicas do metabolismo celular. Corrochanoa et al. 2018, avaliaram as proteínas

do soro de leite após digestão simulada e observaram que a bioatividade de β -lactoglobulina e α -lactalbumina protege as células humanas HT-29 do dano causado por radicais livres, a lactoferrina aumentou significativamente a quantidade de superóxido dismutase 1, 2 e tioredoxina que são enzimas antioxidantes intracelulares. Todas as amostras apresentam atividade inibidora da DPP-IV. Bamdad et al., (2017) observaram os peptídeos de β -LG: f(27–38) DIQKVAGTWYSL, f(33–38) GTWYSL, f(39–48) AMAASDISLL, f(40–48) MAASDISLL, f(61–73) ELKPTPEGDLEIL, f(87–98) IIAEKTIPAVF, f(112–121) DTDYKKYLLF, f(165–172) LSFNPTQL, hidrolisados por subtilinas que apresentaram forte efeito DPP-IV comparado a proteína integra.

2.3.4 Outras bioatividades

Diversas bioatividades de peptídeos são relatadas na literatura, Dziuba e Dziuba (2014) e Sah et al., (2017), descreveram três subclasses de peptídeos antibacterianos catiônicos: peptídeos contendo resíduos Cys que formam ligações de sulfeto e folhas β estáveis; peptídeos catiônicos que contêm Pro e Arg e são principalmente lineares; peptídeos α -helicoidais catiônicos lineares. Além disso, peptídeos aniônicos podem contribuir para a natureza anfifílica de uma molécula (LI et al., 2016).

Os biopeptídeos com atividade anticâncer membranolíticos se assemelham estruturalmente aos biopeptídeos antimicrobianos e mecanismo de ação são relacionados. Os biopeptídeos α -helicoidais apresentam como características uma torção no seu eixo helicoidal, com um comprimento médio de 10 a 30 resíduos de aminoácidos e caráter anfipáticos, com carga líquida catiônica entre +2 e +9 e têm 40 a 60% de conteúdo hidrofóbico de aminoácidos (RIEDL et al., 2011). São ricos em resíduos Alanina, Glicina, Ile, Lisina e Leucina, os peptídeos que apresentam toxicidade tem a presença de Lisina que tem carga positiva (HARRIS et al., 2013). Os biopeptídeos com atividade anticâncer em geral têm um comprimento de 5 a 30 aminoácidos e uma carga catiônica (CHEN et al., 2016).

Outra proteína com atividade anticâncer é a α -lactalbumina bovina, uma proteína do leite com efeito letal às células tumorais. A capacidade de induzir apoptose nas células tumorais L1210 é ampliada se utilizada com ácido oleico (SVENSSON et al., 2003). A pesquisa de Permyakov et al. 2012 mostrou que a complexação da α -lactalbumina bovina com ácido oleico possui a mesma capacidade apoptótica nas células HEP-2. Recentemente, com o

peptídeos ingeridos via oral serão entregues na forma ativa ao organismo. Também observamos os termos ultrafiltração, cromatografia, eletroforese e espectrometria de massa. Esses são os principais métodos analíticos e automatizados utilizadas em concentrar, separar, fracionar e caracterizar os peptídeos. Isso demonstra a atualidade do assunto e o crescente interesse da comunidade científica no desenvolvimento de técnicas alternativas e isolamento de novos peptídeos bioativos do soro de leite.

As propriedades estruturais de peptídeos, como o tamanho do peptídeo ou hidrofobicidade determinam não apenas sua reatividade, mas também sua estabilidade e biodisponibilidade (Antioxidante, Anti-inflamatória e Antidiabética).

Uma questão que deve ser considerada são as interações da matriz alimentar com os peptídeos, uma vez que os alimentos podem causar modificação química que podem levar a alteração na bioacessibilidade e/ou biodisponibilidade dos peptídeos do soro do leite.

2.3.5 Digestão gastrointestinal

A atividade biológica de peptídeos pode sofrer alteração após digestão. As proteínas alimentares e peptídeos ingeridos via oral passa pelo processo de digestão gastrointestinal, liberando aminoácidos por ação enzimática e fermentação microbiana, podendo gerar biopeptídeos. A primeira ação acontece no estômago pela enzima pepsina e pelo ácido estomacal. No estômago ocorre a liberação de aminoácidos e a maioria dos peptídeos liberados, passam para o intestino. No intestino delgado ocorre a ação de endoproteases pancreáticas como a tripsina e quimiotripsina e depois por exopeptidases como carboxipeptidase e aminopeptidase A (SEGURA-CAMPOS et al., 2011, WOODLEY, 1994). A membrana da borda da escova do intestino delgado é dobradiça, fornecendo maior superfície para atividade metabólica como transporte de nutrientes e secreção enzimática (WOODLEY, 1994). Os peptídeos com menor peso molecular são ainda digeridos para liberar aminoácidos por ação de proteases e aminopeptidases, secretadas por células epiteliais do intestino delgado na membrana luminal. Na etapa final são removidos os aminoácidos com grupamento carboxila e amino nas extremidades. Cerca de 20 peptidases são secretadas na membrana luminal pelas células epiteliais. A ação dessas enzimas ocorre por rompimento das ligações peptídicas liberando aminoácidos, a absorção de aminoácidos acontece via transporte ativo secundário de sódio, ou seja, existem 20 tipos de transportadores de aminoácidos. Os peptídeos compostos por 2 ou 3 aminoácidos são absorvidos via transporte ativo secundário,

baseado no gradiente de hidrogênio ionizado ou transportador PepT1 (WIDMAIER et al., 2013).

Alguns peptídeos bioativos são capazes de resistir à ação das proteases, estando relacionada à sua estrutura característica. Peptídeos incluindo prolina ou hidroxiprolina e dipeptídeos ou oligopeptídeos com prolina no terminal C tem maior resistência a ação das enzimas digestivas (BOELSMA; KLOEK, 2009; MAENO et al., 1996; VAN PLATERNIK et al., 2006) impermeabilidade dificultada pelo epitélio gastrointestinal (CATNACH et al., 1994), bem como parâmetros da água, camada mucosa, da membrana epitelial dos enterócitos (via transcelular), e das junções estreitas entre as extremidades apicais das células epiteliais (via paracelular) (YIN et al., 2014).

Avaliados os peptídeos do soro do leite, produto de hidrólise por Alcalase, Neutrase e Bromelaina, e submetidos a digestão, as amostras sofreram uma diminuição na atividade antioxidante (CORROCHANO et al., 2019). Os resultados de Power-Grant et al., (2015), sugerem que atividade antioxidante do soro de leite hidrolisado previamente melhora a atividade antioxidante pelo método após digestão ($363,05 \pm 33,90$ μmol de TE/g de pó) demonstrou valores de inibição superior ao intacto ($136,62 \pm 10,18$ μmol de TE/g de pó) soro de leite hidrolisado GH 32% ($373,91 \pm 22,98$ μmol de TE/g de pó) e GH 45% ($776,92 \pm 14,64$ μmol de TE/g de pó), para o soro de leite previamente hidrolisado e digerido GH 32% $444,89 \pm 20,64$ μmol de TE/g e GH de 45% condições gástricas exibiu $606,13 \pm 45,40$ μmol de TE/g pelo método ORAC. O processo de digestão pode alterar a estrutura e funcionalidade dos peptídeos, necessitando de mais estudos para melhor compreensão dos efeitos pós-digestão e avaliar a necessidade de hidrolisar previamente a proteína.

Com o processo de hidrólise a intenção é obter pequenos peptídeos, di-, tri- e tetrapeptídeos, pois à sua biodisponibilidade é melhorada uma vez que podem ser capazes de sobreviver à digestão gastrointestinal. A absorção de aminoácidos acontece via transporte ativo secundário de sódio, os peptídeos compostos por 2 ou 3 aminoácidos são absorvidos via transporte ativo secundário, baseado no gradiente de hidrogênio ionizado ou transportador PepT1 (WIDMAIER et al., 2013), na presença do aminoácido prolina, esses peptídeos, podem passar o sistema digestório sem sofrer degradação. De acordo com Lorenzetti et al., (2020), a digestão de hidrolisados mantém a mesma carga proteica após a digestão, os peptídeos podem chegar disponíveis para absorção no íleo, ocorrendo uma diminuição do peso molecular, sendo encontrados em maior quantidade di e tri peptídeos, o que podem melhorar a atividade biológica.

É importante ressaltar que os peptídeos serão absorvidos na porção do intestino delgado, Joubran et al. (2015), avaliaram a capacidade antioxidante de peptídeos de α -LA utilizando um modelo *in vitro* do intestino infantil. Foi observado que as amostras duodenais infantil apresentam atividade antioxidante superiores do que as amostras de duodeno *in vitro* de adulto, já as amostras do estômago ocorreu o contrário, apresentando maior atividade antioxidante do modelo *in vitro* adulto. A atividade antioxidante não está relacionada apenas a localização da fase de digestão, mas também para o período de vida. Nota-se que é importante avaliar as duas etapas, intestino e estômago, pois, alguns peptídeos são absorvidos também no estômago (DUPONT et al., 2010). Os modelos de digestão estática simulada *in vitro*, se aproximam muito do modelo *in vivo*. Sanchón et al., 2018, avaliaram o perfil de peptídeos do leite liberados por digestão em modelos *in vivo* e modelo *in vitro* do protocolo padronizado infogest por Mikenus et al., (2014), os resultados foram próximos se comparado as sequencias de aminoácidos, fosforilação e regiões de resistência a hidrólise enzimática.

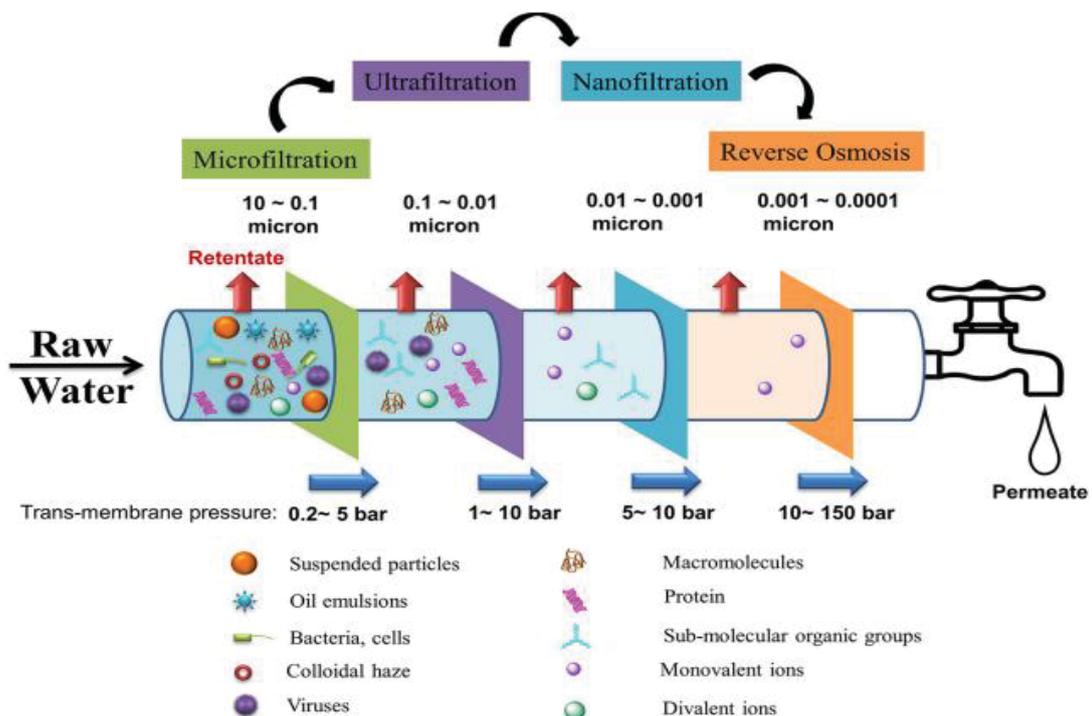
2.3.6 Métodos tradicionais de separação e caracterização de peptídeos

O método de separação por membranas consiste em um sistema físico, operando sem aquecimento e com altocontrole seletivo (ALONSO et al., 2018). Os processos de separação de forma contínua têm como vantagem não utilizar solventes ou a salga para purificação e isolamento de peptídeos, diferente dos métodos descontínuos, eles permitem destruição mínima, fácil retorno do produto ao alimento ou produtos nutracêuticos (ZHANG et al., 2013). As membranas são barreiras físicas que atuam de forma seletiva, visando à separação, concentração e/ou a purificação de componentes presentes em solução (ALONSO et al., 2018; LIAO et al., 2018; POWER et al., 2014). O fluxo transmembranar separa duas fases, alimentação e permeado, restringindo o transporte de uma ou mais espécies presentes nestas fases (LIAO et al., 2018; POWER et al., 2014)..Neste tipo de processo, a separação é baseada, essencialmente em exclusão por tamanho molecular dos compostos (LEWIS; GRANDISON, 1996), este é o caso de processos de Microfiltração (MF) e Ultrafiltração (UF). Assim, quanto maior a porosidade da membrana e o tamanho dos poros, maior a quantidade de água absorvida pela membrana, o que resulta na redução da superfície de contato (SARASWATHI et al., 2019). A caracterização das membranas ocorre em função do tamanho dos poros, e são conhecidas como membranas de Microfiltração (MF), Ultrafiltração (UF), Nanofiltração (NF) e Osmose Inversa (OI). A escolha da membrana se deve de acordo com a natureza do

produto, do tipo de soluto e presença ou não de partículas suspensas. (HABERT; BORGES; NÓBREGA, 2006).

O tamanho do orifício do poro das membranas definirá a resistência para transferência de massa, ou seja, quanto menor o tamanho de passagem, maior terá que ser a pressão aplicada para operação (força motriz), a fim de ter um fluxo de permeados economicamente viáveis. Na Figura 6 são apresentadas as principais características dos processos de separação por membranas que utilizam a diferença de pressão como força motriz (HABERT; BORGES; NÓBREGA, 2006).

Figura 6 - Características de processos que utilizam diferença de pressão como força motriz.



Fonte: LIAO et al., (2018).

A ultrafiltração (Figura 6) é um processo de separação muito utilizado na indústria de laticínios (ALONSO et al., 2018). As membranas de UF podem ter poros com diâmetro de 1 e 100 nm, podendo tratar por esse processo soluções contendo solutos numa faixa de massa molar entre 10^3 – 10^6 Dalton. Em comparação com os poros das membranas de MF, os poros das membranas de UF apresentam tamanhos menores, sendo necessária uma força motriz ainda maior (HABERT; BORGES; NÓBREGA, 2006).

Os fluxos de permeado em UF situam-se na faixa de 150 a 250 l/h.m². Porém, fluxos bem menores podem ser obtidos em função da polarização por concentração e da incrustação, em função da natureza do soluto e sua interação com os componentes da membrana, das condições de operação do sistema e da estabilidade mecânica da membrana (HABERT; BORGES; NÓBREGA, 2006).

As principais causas de redução dos fluxos de permeado estão associadas a polarização por concentração, que causa um rápido declínio, e a incrustação, que causa declínio gradual e lento no fluxo. A incrustação se deve ao acúmulo de partículas e/ou a cristalização/precipitação de pequenas moléculas na superfície e nos poros da membrana, e sua extensão depende das características da solução a ser filtrada assim como da interação desta com a membrana. As condições de operação, tais como a pressão transmembrana e a velocidade de escoamento, também exercem efeito direto nos fenômenos de polarização e incrustação. Maiores velocidades de escoamento induzem a turbulência na superfície da membrana, reduzindo a possibilidade de formação de zonas de concentração, e assim, a polarização por concentração. A pressão transmembrana aumenta linearmente com a pressão até um dado limite, que depende das propriedades do sistema. Em baixas pressões, o fluxo é governado essencialmente pela Lei de Darcy, enquanto que para altas pressões o fluxo se torna independente da pressão devido a polarização por concentração e formação de gel e/ou torta na superfície da membrana, tornando-se uma resistência adicional ao escoamento. Geralmente, a pressão transmembrana escolhida é aquela na qual a relação fique mais próxima da linearidade (BRIÃO; TAVARES, 2012; GIRARD; FUKUMOTO, 2000).

As resistências presentes nos processos de separação por membranas podem ser sumarizadas em três resistências principais: resistência hidráulica oferecida pela membrana limpa e a resistência adicional, formada pela soma da resistência da incrustação e pela deposição irreversível na superfície da membrana, como adsorção; e pela resistência devido ao fenômeno reversível de polarização por concentração, (GÉSAN-GUISIOU et al., 1999).

Operações com membranas de filtração representam uma opção viável para o processamento do soro de leite. Os processos por sistemas automatizados se tornam mais econômicos pelo fato de não utilizar calor e, conseqüentemente, não envolver mudança de fase (ALONSO et al., 2018). A combinação de hidrólise enzimática com a tecnologia de membranas permite a obtenção de peptídeos dentro de uma faixa de massa molecular, que exibem atividades biológicas além de possuírem alto valor nutricional, sendo assim uma forma bastante promissora de valoração das proteínas do soro (POWER, et al., 2014;

O'KEEFFE et al., 2017; ALONSO et al., 2018). Existe na literatura um número considerável de processos para purificação e separação das proteínas do soro como métodos cromatográficos (SANTOS; TEIXEIRA; RODRIGUES, 2011), métodos eletroquímicos (MELCHIOR et al, 2016), adsorção (BU et al., 2020), eletroforese (CORROCHANO et al., 2019), microfiltração e ultrafiltração por membranas (STEINHAEUER, 2015).

A eletroforese em gel (SDS-PAGE) é uma técnica de separação de proteína e peptídeos, as (CORROCHANO et al., 2019). A composição de formação do gel é uma rede polimérica, estabilizada por ligações N, N-metil-bis-acrilamida. O gel pode ser preparado em diferentes concentrações, o que pode influenciar no tamanho dos poros (SCHÄGGER; JAGOW, 1987). A limitação do método é para proteínas acima de 10kDa, quando substituído o tampão glicina por Tricina é possível separar fragmentos com peso molecular de 1 a 100kDa (SCHÄGGER; JAGOW, 1987 CORROCHANO et al., 2019).

As facilidades nos padrões de separação com alta qualidade de resolução e capacidade de analisar amostras de proteínas diluídas em microgramas auxiliaram o SDS-PAGE de Laemmli tornou-se uma das técnicas mais citadas em ciências biológicas. Além disso, o SDS-PAGE é um dos métodos mais utilizados para analisar os peptídeos constituintes em 1D e 2D. É possível analisar 1000mg de polipeptídeos por 1400mg de SDS. A interação da proteína com o SDS ocorre normalmente nessa proporção (REYNOLDS; TANFORD, 1970), a carga intrínseca das cadeias polipeptídicas ficam mascaradas, de modo fica razoavelmente constante a carga líquida por unidade de massa. (REYNOLDS; TANFORD, 1970).

Os polipeptídeos tem densidade próxima do gel de poli(acrilamida) com poros de tamanho correto, facilitando a interação com o poro do gel de acordo com tamanho do raio molecular que se aproxima. Seleção em uma técnica de eletroforese acontece como um peneiramento de moléculas (HAMES, RICKWOOD, 1990; DUNN, HARRIS, ANGAL, 1989).

Para análise de peptídeos e proteínas a técnica de HPLC e / ou UHPLC podem ter várias aplicações como métodos capazes de quantificar anticorpos como rituximab (NAVAS et al., 2013) caracterização da insulina, além de seus produtos de degradação por cromatografia líquida de fase reversa e exclusão por tamanho, acoplada a um detector de dispersão de luz (OLIVA; FARIÑA; LLABRÉS, 2000) e isolamento de peptídeos da matriz proteica (GIRGIH et al., 2013).

A Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) associada à espectrometria de massa fornece maior sensibilidade e capacidade de processamento para quantificação

produtos de alto peso molecular (LIU et al., 2007). Uma demanda que cresce é a quantificação de amostras de substâncias de baixo peso molecular, especialmente na proteômica alvo (SHI et al., 2016; TODOROKI et al., 2018)

Para o desenvolvimento de uma técnica cromatográfica é importante selecionar a coluna do cromatógrafo a fim de ter resultados mais consistente (XU et al., 2017) As colunas de C18 de fase reversa permite uma eluição rápida, devido á alta porosidade, sendo assim mais rápido o tempo de execução, porém, isso pode reduzir o pico de resolução e a interação entre fase estacionária e amostra analisada. Na fase móvel pode ser utilizado solventes com solubilidade de acordo com a natureza do analito e pH (BACHHAV; KALIA, 2011), podendo ser adicionado solventes voláteis para aumentar a sensibilidade e o sinal do pico cromatográfico (HUIMIN et al., 2015).

Em proteômica a detecção em ultravioleta tem resultados de forma linear, alta sensibilidade, reprodutibilidade e precisão (SHI et al., 2016)

As amostras precisam ser previamente preparadas para quantificação por HPLC de acordo com o sistema de detecção para quantificação (KIM et al., 2018). As proteínas são um componente endógeno em amostras biológicas como sangue, urina e leite. As proteínas podem precipitar e entupir a coluna do cromatografo se não forem tratadas previamente (CARMICAL; BROWN, 2016; LOPES; BARREIRO; CASS, 2016, DITTRICH et al., 2015) O pré tratamento com extração em fase sólida (SPE) é um procedimento que não altera a concentração da droga analisada e permite retirar os fosfolípidos (Carmical; Brown, 2016) e proteínas (LOPES; BARREIRO; CASS, 2016)

O método de separação é realizado por cromatografia líquida de fase reversa C18 e caracterização é feita por espectrometria de massa com técnicas leve como MALDI e ESI (FENN et al., 1989; STULTS, 1995). O espectrômetro de massa faz a captura dos íons e mede individualmente a intensidade dos íons, o resultado é a quantificação do quociente de massa para carga da molécula ionizada (m/z) (KARPIEVITCH et al., 2010). Em análise de biopeptídeos, os peptídeos médios têm de 7 a 25 aminoácidos com aproximadamente 800 a 2500 Da. Os peptídeos são detectados pela medida da fragmentação precisa da massa do peptídeo precursor e íons formados. Existem várias técnicas como dissociação induzida por colisão (CID) (WELLS; MCLUCKEY, 2005), dissociação multifotônica por infravermelho (IRMPD) (LITTLE et al., 1994) fragmentação induzida por colisão de alta energia (HCD) (OLSEN et al., 2007), dissociação por captura de elétrons (ECD) (ZUBAREV et al., 2000) e dissociação por transferência de elétrons (ETD) (SYKA et al., 2004).

Os íons formados pela fragmentação são analisados de acordo com o tipo de instrumento. Por exemplo, em digestão trípica, todos os peptídeos tem grupo amina no N terminal e um terminal C (cadeia lateral de arginina C terminal ou resíduo de lisina). Várias ferramentas desenvolvidas compara o espectro de íons produtos peptídicos com banco de dados de proteínas alvo com digestão em sílica, por cruzamento dados e pontuações probabilística (PERKINS et al., 1999; GEER, 2004; CRAIG; BEAVIS, 2004). Peptídeos grandes maiores que 25 Aminoácidos são fragmentados usando técnicas clássicas de CID ou ECD (VELLAICHAMY et al., 2010). Os peptídeos ou moléculas de baixo peso molecular como os, tri e tetra-peptídeos, são de difícil análise e sua atividade biológica diminui com o aumento da cadeia, tornando essa categoria uma das mais interessantes (ROBERTS et al., 1999; PAIZS; SUHAI, 2005). Peptídeos pequenos com menos de 7 Aminoácidos, podem ser analisados pelo instrumento analisador do tempo de voo quadrupolo (Q-tof), a seletividade pode ser aumentada usando a fragmentação de energia de alta colisão (PAIZS; SUHAI, 2005).

Um método informatizado de analisar os peptídeos registrados são bancos de dados. Com as informações que pesquisadores compartilham nos bancos de dados online é possível analisar atividade biológica, sequências de aminoácidos, possíveis mecanismo de ação, etc. O estudo de bioinformática possibilita diversas previsões de bioatividades a partir de dados já registrados. Uma das bases de dados é o EROP-Moscow (ZAMYATNIN et al., 2006), trazendo conhecimento de oligopeptídeos reguladores endógenos (n = 22.561). O EROP-Moscow traz descrições de 2 à 50 resíduos de aminoácidos, descrevendo a estrutura de oligopeptídeos, sua fonte, modificações pós transcricionais e função. (Link: <http://erop.inbi.ras.ru>)

O banco de dados BIOPEP-UWM (MINKIEWICZ; IWANIAK; CHAIR, 2019) é um aplicativo que permite abordagens computacionais, possui armazenadas proteínas n=740, peptídeos bioativos n=3.957, proteínas com epítomos alergênicos n=135, peptídeos sensoriais e aminoácidos n=483. O aplicativo possibilita anotações de sequências de aminoácidos, prever a possível atividade biológica, previsão de hidrólise das ligações peptídicas e sítio de ação das enzimas endoproteases que liberam peptídeos c-n terminais (Link: <http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/pl/biopep>).

2.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta revisão apresentou as técnicas tradicionais utilizadas para hidrolisar os peptídeos com atividade bioativa a partir do soro de leite. O soro de leite tem proteínas com alto potencial funcional que após hidrólise e digestão melhoram a bioatividade, tornando o soro de leite um produto de valor agregado para enriquecimento de alimentos e aplicação na terapia de doenças metabólicas. O estresse oxidativo celular causa danos no organismo patogênese de doenças metabólicas, o desenvolvimento de peptídeos com atividade antioxidante é o campo de maior concentração das pesquisas. Contudo, mais estudos são necessários para obter alto grau de hidrólise e expor as sequências específicas de aminoácidos no sítio ligante bioativo.

Os peptídeos se ingeridos via oral passam por digestão, as ações do sistema digestório podem alterar a estrutura. Com isso, a bioatividade pode ser melhorada ou em alguns casos diminuir o efeito biológico. Mais estudos são necessários para entender a cinética de um peptídeo submetido a digestão.

A função biológica está relacionada com o tamanho molecular e sequência específica de aminoácidos. Técnicas são necessárias a fim de separar os peptídeos e determinar o perfil molecular. As técnicas automatizadas de operações com membranas de filtração representam uma opção viável para o processamento do soro de leite. A combinação de hidrólise enzimática combinado com a tecnologia de membranas permite a obtenção de peptídeos dentro de uma faixa de massa molecular, que exibem atividades biológicas além de reduzir os compostos alergênicos. Técnicas como eletroforese, métodos cromatográficos e espectrometria de massa auxiliam na análise de perfil molecular, a espectrometria analisa as sequências de aminoácidos como Q-tof.

3 CAPÍTULO 3 – BIOATIVIDADE DE PEPTÍDEOS DO SORO DE LEITE OBTIDOS POR HIDRÓLISE E ULTRAFILTRAÇÃO EM CONDIÇÕES GASTROINTESTINAL SIMULADAS

Este capítulo apresenta o artigo científico sobre a hidrólise, purificação de peptídeos obtidos a partir do soro de leite e o efeito gastrointestinal nas atividades biológicas desses peptídeos.

3.1 INTRODUÇÃO

O soro de leite é um subproduto da indústria de laticínios liberado pela coagulação da caseína do leite na produção de queijo. As proteínas do soro são altamente nutritivas (SMITHERS, 2008), sendo as principais proteínas que compõem o soro de leite são a β -lactoglobulina (β -Lg), α -lactalbumina (α -La), imunoglobulina (Ig), albumina sérica bovina (BSA) e lactoferrina (MOLLEA, MARMO E BOSCO, 2013).

Na composição do soro, além das proteínas, encontram-se gorduras, lactose, vitaminas e minerais. O soro de leite deixou de ser considerado um resíduo e passou a ser tratado como subproduto, e diversas técnicas são desenvolvidas para valorizar o soro de leite, mas mesmo assim ainda tem uma grande quantidade sendo descartada (ZOTTA et al., 2020). Segundo dados da FAO (2018), foram produzidos 19,3 milhões de toneladas de queijo do leite de vaca integral e desnatado 2,5 milhões de toneladas. Se considerarmos que para cada 1 kg de queijo produzido são liberados 10 L de soro, (ZOTTA et al., 2020), cerca de 210 milhões de toneladas de soro de leite de vaca são produzidas anualmente. Ainda segundo FAO (2018), foram produzidos cerca de 2,8 milhões de toneladas de soro de leite seco e 471 mil toneladas de soro de leite concentrado.

Explorar as propriedades funcionais é uma alternativa de valorizar o soro de leite. O desenvolvimento de produtos a base do soro de leite é inovador do ponto de vista nutracêutico, econômico e ambiental, e até o momento a indústria ainda não conseguiu obter produtos funcionais e derivados, como exemplo o soro de leite concentrado 35% (BALLATOREA et al., 2020), 80% (QIU et al., 2015) e 95 % de proteínas (CORROCHANO_b et al., 2018).

As proteínas em geral, podem ter peptídeos criptografados na sua estrutura, que por processo de digestão são liberados, absorvidos e transportados para os órgãos, atuando em

diversas vias metabólicas específicas, contribuindo de forma positiva à saúde, sendo assim chamado também de biopeptídeos (CICCAGLIONE et al., 2019; LACROIX et al., 2016; LI et al., 2019).

A produção de peptídeos é estudada por hidrólise de proteínas com enzimas digestivas (CORROCHANO^a et al., 2018; BAMDAD et al., 2017; BU et al., 2020), mas existem outras rotas como a fermentação microbiana (TOLDRA et al., 2018) e hidrólise enzimática com enzimas comerciais (ADMASU et al., 2018). No entanto, além da clivagem, é necessário também fazer a separação dos peptídeos produzidos. Os processos de forma contínua, métodos de separação e concentração de peptídeos, têm como vantagem não utilizar solventes ou a salga para purificação e isolamento (KITTS; WEILER, 2003), a separação por membranas como a ultrafiltração é uma barreira física seletiva, (BALDASSO, 2011) baseado na exclusão por tamanho molecular dos compostos, (LEWIS; GRANDISON, 1996) atuando como uma espécie de peneira molecular.

Dentre as diversas funções biológicas, os peptídeos podem apresentar ação anti-inflamatória, antidiabética (MOHAMED et al., 2018) e principalmente diminuição de estresse oxidativo (antioxidante) (NIELSEN, BEVERLY, QU, DALLAS, 2017). A origem do estresse oxidativo vem do metabolismo celular de carboidratos para produção de energia em forma de ATP (OYEDEMI et al., 2017). As espécies reativas mais populares são o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), o radical hidroxila (OH⁻), o anion superóxido O₂ e o ácido hipocloroso HOCl (HARE et al., 2018). A inflamação nas células β pancreáticas, causada por estresse oxidativo, como exemplo, o HOCl, é apontada como principal patogênese do desenvolvimento da diabetes mellitus tipo 2 (HANCHANG et al., 2019). Um dos alvos terapêuticos no manejo do DM tipo 2 é a inibição da α- glucosidase e α- amilase para diminuir a reabsorção de glicose no intestino (SIM; JAYAKANTHAN; MOHAN, 2010) estudos indicam a propriedade inibidora de enzimas glicolíticas por hidrolisados proteicos. Sendo assim, os peptídeos podem apresentar multipropriedades funcionais, atuando como antioxidantes, como anti-inflamatórios e como antidiabéticos por diversos mecanismos em cinergismo.

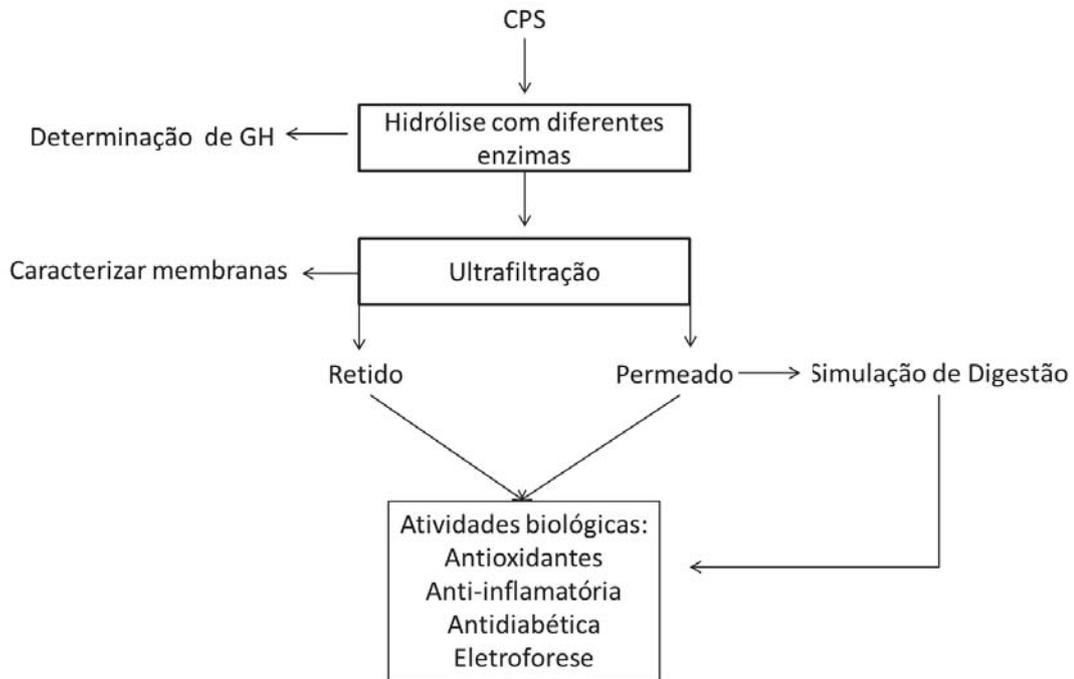
Entretanto, colocamos em questão qual o comportamento de bioacessibilidade e bioatividade do soro de leite intacto e peptídeos derivados do soro antes e após submetido a digestão estática gastrointestinal simulada. Os alimentos proteicos quando ingeridos via oral são submetidos ao processo de digestão, podendo sofrer ação química, física ou enzimática (MINEKUS et al., 2014) o que pode impactar na função biológica. Os modelos estáticos de

digestão gastrointestinal simulada permitem uma triagem para compreensão da bioacessibilidade de alimentos e produtos farmacêuticos como os biopeptídeos. O objetivo do trabalho foi desenvolver conhecimento teórico metodológico sobre a bioacessibilidade de peptídeos do soro de leite após simulação estática gastrointestinal *in vitro* como triagem para construção de novas hipóteses de bioacessibilidade e avaliar a influência na atividade funcional. Os objetivos específicos foram: a) Avaliar a hidrólise controlada para a produção de peptídeos a partir de proteínas do soro de leite; b) Separar e fracionar os biopeptídeos por ultrafiltração, avaliando suas atividades biológicas (antioxidante, anti-inflamatória e antidiabética); c) Caracterizar a estabilidade dos biopeptídeos e avaliar suas atividades bioativas após simulação gastrointestinal.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

O concentrado proteico do soro de leite (CPS) utilizado foi gentilmente doado pela empresa Globalfood Advanced Technology e enviado para a Universidade de Passo Fundo (UPF). O método de trabalho seguiu o esquema da Figura 7. As etapas principais foram à hidrólise das proteínas, ultrafiltração, simulação gastrointestinal e avaliação de atividades biológicas. O CPS foi caracterizado e submetido à hidrólise enzimática, utilizando enzimas comerciais em batelada individuais (Alcalase e Neutrase) e bateladas conjuntas (Alcalase + Neutrase), deste modo, adicionaram-se a primeira enzima e em sequência a segunda enzima, utilizando como parâmetro de tempo de adição o grau de hidrólise. Essa etapa objetivou selecionar diminuir o tamanho molecular dos peptídeos. A solução de hidrolisado foi então submetida a ultrafiltração por membranas para a purificação. As três frações da ultrafiltração (alimentação, retido e permeado) foram analisadas quanto às atividades biológicas (Antioxidante, Anti-inflamatória e Antidiabética). As frações de corrente permeado e concentrado proteico do soro de leite foram submetidas à simulação gastrointestinal estática e comparadas às atividades biológicas em relação à proteína íntegra, proteína hidrolisada antes da digestão e pós-digestão (proteína íntegra e hidrolisada). Foram analisadas ainda a média das cadeias polipeptídicas por eletroforese em gel.

Figura 7: Fluxograma geral dos processos utilizados neste trabalho.



Fonte: elaborado pelo Autor, 2020

Foi utilizado o concentrado proteico do soro de leite com aproximadamente 35% de proteína, fornecido pela empresa Global Food. A análise composicional (gordura, lactose e proteína) do soro de leite foi determinada no Laboratório de Serviço de Análise de Rebanhos Leiteiros (SARLE) da UPF, através do equipamento de Espectroscopia no infravermelho próximo (FTIR) de marca Delta Instruments. As enzimas utilizadas para hidrólise proteica foram a Alcalase® 2.4 L FG, uma serino endopeptidase de origem microbiana produzida a partir de *Bacillus licheniformis*, e a Neutrase 0,8L, uma metaloendoprotease de origem microbiana produzida a partir de *Bacillus amyloliquefaciens*, ambas fabricadas pelo laboratório Novozymes e gentilmente cedidas pela empresa LNF Latino Americana. A membrana de ultrafiltração era membrana de formato tubular, com massa molar de corte de 10 kDa, fabricada pela Koch Membrane Systems e adquirida da WGM Sistemas (São Paulo, Brasil).

3.2.1 Hidrólise do CPS

Previamente o soro de leite concentrado foi aquecido a 90°C por 10 min para abrir a estrutura das proteínas e facilitar a ação das enzimas de acordo com Ballatore et al., (2020). Para hidrolisar as proteínas do soro foram utilizadas diferentes enzimas comerciais individualmente, em batelada, utilizando-se como resposta o GH. Após hidrólise, a amostra foi submetida a ultrafiltração.

Para a hidrólise proteica, adicionou-se um litro de solução proteica do CPS em um béquer, mantendo-se sob agitação magnética 300 rotações por minuto (rpm) e temperatura controlada com o auxílio de uma manta de aquecimento de marca Fisatom. As concentrações das diferentes enzimas (calculadas em relação à carga proteica) e as temperaturas de hidrólise seguiram indicações dos fornecedores e foram ajustadas conforme a Tabela 3. O pH foi ajustado com NaOH 1 molar ou ácido clorídrico 1 molar.

Tabela 3- Enzimas, condições e inativação de hidrólise utilizadas

Enzimas	Ação	pH	Temperatura (°C)	%Enzima	Inativação
Alcalase	Endoprotease	8,0	55	2,2	90°C / 20min
Neutrase	Metaloendoprotease	7,0	55	0,5	90°C / 20min

Fonte: Adaptado de Novozymes (2014)

Além das enzimas e condições testadas na Tabela 3, uma terceira condição foi avaliada, pela ação sequencial da Alcalase + Neutrase, escolhidas por apresentarem diferentes mecanismos de ação (serina endoprotease e metaloprotease).

3.2.2 Grau de Hidrólise (pH-Stat)

A avaliação do grau de hidrólise (GH) foi realizada através do método do pH-stat, de acordo com descrito por Adler-Nissen (1986), cuja técnica vale-se do fato de que quando a hidrólise é realizada em pH ácido libera grupos OH⁻, a hidrólise em pH básico libera H⁺. Portanto a hidrólise em pH ácido aumenta o pH do meio e hidrólise em pH básico diminui. As enzimas têm o pH ótimo de trabalho, e a reação é controlada com HCl ou NaOH. Assim, quando há correlação linear com o grau de hidrólise, o número de ligações peptídicas clivadas pode ser estimado pelo método pH-stat de acordo com a Equação 1 (ADLER-NISSEN, 1986).

$$GH = \frac{(h)}{(H_{tot})} \times 100 \quad (1)$$

sendo:

GH: grau de hidrólise

h: Número total de ligações peptídicas antes da reação;

H_{tot} : número máximo de ligações peptídicas em uma proteína (dado em mequivalentes / proteína g)

Assim, quando há correlação linear com o grau de hidrólise em meio alcalino, o número de ligações peptídicas clivadas pode ser estimado pelo método pH-stat calculando a quantidade de base de forma contínua, requerida para manter o pH controlado durante a com modificação da equação 1 pela Equação 2 de acordo com Adler-Nissen, (1986).

$$GH = VB * N * \frac{1}{M_p} * \frac{1}{h_{tot}} * \frac{1}{\alpha} * 100 \quad (2)$$

GH: grau de hidrólise

B: Volume de base consumida durante a hidrólise para manter o pH constante (mL);

N: Normalidade da base;

M_p : Massa de proteína (g);

α : Grau de dissociação;

h: Número total de ligações peptídicas antes da reação;

δ : mol equivalente/kg de proteína;

Para o Grau de dissociação, equação 3:

$$\alpha = \frac{1}{(1 + 10^{pK - pH})} \quad (3)$$

sendo:

α : Grau de dissociação;

pK: Varia de acordo com a temperatura da reação;

pH: Constante;

Para o pK, equação 4:

$$pK = 7,8 + \frac{(298-T)}{(298 \times T)} \times 2400 \quad (4)$$

sendo:

T: Temperatura em Kelvin

Em condições do pH do meio ácido, o volume adicionado de HCl pode ser correlacionado com o grau de hidrólise pelo método pH-stat. O grupo específico liberado por alterar o pH do meio é o ácido carboxílico e a ionização dos íons OH⁻, calculado pela modificação da equação 2 pela equação 5 de acordo com Diermayr & Dehne (1990).

$$GH = \frac{F_{pH} \cdot V_{HCl} \cdot N_{HCl}}{MP \cdot H_{tot}} * 100 \quad (5)$$

GH: grau de hidrólise

F_{pH}: é um fator de correção e é influenciado pelo valor de pH entre 25° C e 50° C

V_{HCl}: Volume de HCL consumida durante a hidrólise para manter o pH constante (mL);

N: Normalidade do HCl;

M_p: Massa de proteína (g);

H_{tot}: número máximo de ligações peptídicas em uma proteína (dado em mequivalentes / proteína g)

Para o cálculo do GH, o conteúdo de base consumida foi registrado em função do tempo, inicialmente fixado em intervalos de 10 minutos e aumentando gradativamente para intervalos de 30 minutos até que as variações do consumo da base sejam insignificantes.

3.2.3 Cálculo do comprimento médio da cadeia e da massa molecular média dos peptídeos

O comprimento médio da cadeia (CMC) e a massa molecular média (MMM) dos hidrolisados foram determinados através das Equações 6 e 7, respectivamente, assumindo-se que um resíduo de aminoácido possua massa média de 120 Da, conforme descrito por Perea et al. (1993).

$$\text{CMC} = \frac{100}{\text{GH}} \quad (6)$$

$$\text{MMM} = \text{CMC} * 120 \quad (7)$$

3.2.4 Ultrafiltração (UF)

3.2.5 Caracterização inicial da membrana

Para operações com membranas, avaliações preliminares devem ser conduzidas com água para determinar as condições iniciais como permeabilidade, resistência e fluxo de permeado em função da pressão e temperatura empregadas. Este procedimento inicial permite conhecer o comportamento das membranas para as condições a serem empregadas no processo, evitando interferências de compostos que possam causar polarização ou incrustação. O objetivo principal é criar uma referência de fluxo ideal para conduzir o procedimento de limpeza após os ensaios com a solução hidrolisada até que se restabeleça o fluxo inicial.

O processo foi conduzido de acordo com o método descrito por Habert, Borges e Nobrega (2006). O tanque foi alimentado com 5 L de água destilada e acionada a bomba, com reciclo total para o tanque. O permeado foi coletado em triplicata e o fluxo calculado através da Equação 8. Tais medidas foram conduzidas com água a 55°C, simulando a mesma condição que será usada no ensaio com hidrólise.

O fluxo de permeado (F_p) foi obtido através da Equação 1.

$$F_p = \frac{V}{(t.A)} \quad (8)$$

sendo:

V: volume de permeado coletado num determinado tempo;

t: tempo de obtenção do permeado durante o qual a amostra foi coletada;

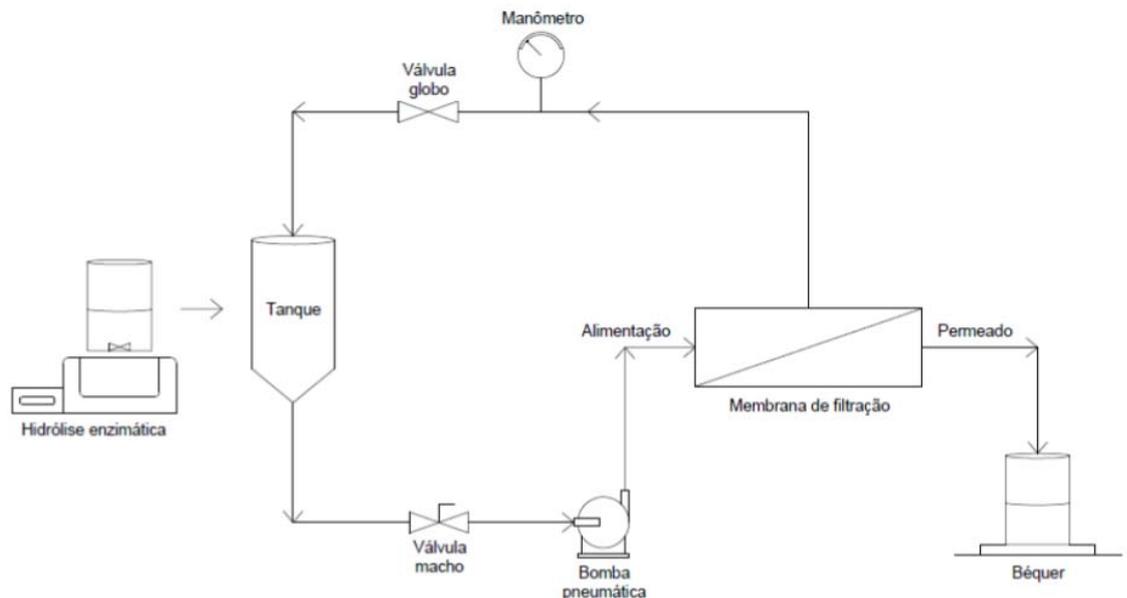
A: área de filtração da membrana.

3.2.6 Ultrafiltração do concentrado proteico hidrolisado

A membrana utilizada é de Ultrafiltração fornecida pela WGM Sistemas, de configuração tubular, com área efetiva de 0,1 m² e massa molar de corte de 10 kDa. A membrana foi selecionada por referência de Barry et. al. (2017), os quais concluíram que esta membrana permite a separação dos peptídeos e também difere do tamanho molecular das enzimas.

O equipamento de bancada foi adquirido da WGM Sistemas. A solução proteica foi bombeada através da bomba pneumática até o módulo de membrana, cujo fluxo se dá na forma tangencial, conforme esquema da Figura 8. O equipamento é composto por um tanque de aço inoxidável com capacidade de 30 L, sendo a pressão (100 kPa) ajustada com uma válvula de diafragma na linha de retido, lendo-se o fluxo permeado com o auxílio de um rotâmetro na linha de permeado. O permeado foi coletado e o rejeito retornou para o tanque até que se atingiu uma redução de volume da alimentação de 4 vezes. A temperatura do processo foi 50°C.

Figura 8 - Esquema do reator de membrana utilizado ultrafiltrar os hidrolizados de CPS



Fonte: FORTUNA; 2019

3.2.7 Simulador estático de digestão gastrointestinal

A digestão foi conduzida seguindo o modelo estático de simulação da digestão proposto por Minekus et al., (2014) com adaptações de Gallego et al, 2020. O método estático de digestão foi realizado utilizando o equipamento Banho Ultratermoestático SL 152,

fabricado pela Servylab e adquirido pela Solab equipamentos para laboratório (Piracicaba - SP, Brasil). O banho foi aquecido a 37°C, com o intuito de simular a temperatura do corpo humano, sob agitação mecânica 170 rpm para simular os movimentos peristálticos gastrointestinais. Foram retiradas alíquotas das amostras nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 min durante a digestão gástrica e intestinal. Na fase estômago a reação foi interrompida ajustando o pH para 7,0 com solução de NaOH 1 M e inativação com aquecimento em banho maria a 95°C/2 minutos (GALLEGO et al, 2020).

3.2.8 Digestão simulada do esôfago e estômago

O protocolo do experimento foi conduzido de acordo com o ensaio descrito por Minekus et al., (2014). Na fase oral tem adição da enzima amilase, uma enzima responsável pela quebra de amido, esta fase não foi realizada devido ao interesse do nosso estudo ser observar a hidrólise de proteínas, que se inicia no estômago. Na fase estômago, foi preparado previamente uma solução de fluido gástrico simulado, que continha KCl (6,9 mM), KH₂PO₄ (0,9 mM), NaHCO₃ (25 mM), NaCl (47,2 mM), MgCl₂ (0,1 mM), (NH₄)₂CO₃ (0,5 mM) e CaCl₂ (0,15 mM). As amostra de CPS não hidrolisado e CPS hidrolisado, foram diluídas na proporção de 0,03 g de proteína mL⁻¹ em fluido gástrico simulado, contendo pepsina da mucosa gástrica suína (2000 U / mL Sigma®). O experimento controlado ajustando o pH para 2 com solução de HCl 1M.

Após a fase gástrica, uma solução de fluido intestinal que continha que continha KCl (6,8 mM), KH₂PO₄ (0,8 mM), NaHCO₃ (42,5 mM), NaCl (9,6 mM), MgCl₂ (1,1 mM) e CaCl₂ (0,6 mM) no mesmo volume, simulado contendo pancreatina do pâncreas suíno (Sigma®) e extrato biliar suíno (10 mM na mistura final, Sigma®). A fase intestinal foi realizada durante 2 horas, a reação foi controlado ajustando o pH para 6,5 com solução de NaOH 1M.

Na fase intestinal a reação foi inativada com aquecimento em banho maria a 95°C/2 minutos. Após inativação as amostras das fases estomacal e intestinal foram congeladas em ultrafreezer -80°C e armazenadas até as análises de bioatividades. Antes de realiza as análise de bioatividade as amostras foram centrifugados a 4.000 rpm/10 min), e os sobrenadantes resultantes foram analisados.

3.2.9 Caracterização da matéria-prima e dos produtos obtidos

3.3.3.1 Caracterização físico-química

A caracterização do WPC e hidrolisados foi determinada no Laboratório de Serviço de Análise de Rebanhos Leiteiros (SARLE) da UPF, por Espectroscopia no infravermelho próximo (FTIR) de marca DELTA INSTRUMENTS, que segue a metodologia International Dairy Federation (IDF) 141C.

A caracterização quanto ao teor de nitrogênio livre na alimentação foi avaliada pelo método Kjeldahl (AOAC, 1995), para avaliação da hidrólise e da atividade enzimática, utilizando-se 6,38 como fator de conversão.

3.2.10 Eletroforese em gel

O perfil peptídico foi caracterizado em função do tamanho da cadeia dos peptídeos obtidos, relacionado ao seu peso molecular, utilizando a técnica de eletroforese em gel. Os perfis eletroforéticos dos peptídeos foram determinados através de sistema Tris-Tricina-SDS-PAGE, conforme descrito por Jiang et al. (2016), utilizando-se o sistema de eletroforese Mini-Protean II Cell da Bio-Rad com placas de vidro de 6 x 8 cm e espessura de 1,0 mm.

Para polimerização do gel de corrida foram utilizadas soluções de dois monômeros (acrilamida/bis) em duas diferentes concentrações: 5 % e 3 % no gel de aplicação da amostra 18 % e 6 % para o gel de separação. As amostras foram preparadas para aplicação solubilizando-se 100 µL do hidrolisado em 200 µL de tampão (4 % SDS, 12 % glicerol, 50 mM de Tris, 2 % β-mercaptoetanol, 0,01 % azul de Coomassie G250 em pH 6,8).

A corrida foi realizada em duas etapas: a primeira sob uma tensão de 60 V até que as bandas atingissem o gel de separação e 160 V a partir daí até o final da corrida. Para identificação dos peptídeos foram utilizados os padrões de ultra baixo peso molecular, com as seguintes proteínas (em kDa): triose-fosfato isomerase (26,625); mioglobina (16,950); α-lactalbumina (14,437); aprotinina (6,512); insulina β-oxidada (3,496); bacitracina (1,423); e um padrão pré-corado com 12 proteínas de peso molecular entre 2 e 250kDa, Após a corrida o gel foi submerso em solução fixadora (50% metano, 10% ácido acético) por 1 h, e corado com solução corante (0,025 % de azul de Coomassie G250 em ácido acético 10 %) por 2 h. O

descoramento do gel foi realizado em solução descorante (ácido acético 10 %) por 2 h, trocando a solução a cada 30 min.

3.2.11 Atividades Biológicas

As atividades biológicas antioxidantes, anti-inflamatória e antidiabética foram realizadas nas amostras do hidrolisado, hidrolisado ultrafiltrado, amostras de CPS e CPS hidrolisado ultrafiltrado submetidas à simulação gastrointestinal. O estudo também foi realizado em amostras de CPS não digeridos (controle) em que o procedimento foi realizado da mesma forma, mas sem a adição de enzimas.

3.2.12 Atividade Antioxidante

3.2.13 Método ABTS

A atividade antioxidante in vitro dos peptídeos foi determinada usando o teste de descoloração de solução de ABTS, de acordo com o método proposto por Re et al. (1999), onde o radical ABTS•+ é gerado pela oxidação do ABTS com persulfato de potássio, e é reduzido na presença de antioxidantes doadores de hidrogênio, promovendo a redução da absorvância devido à restauração do radical ABTS+ na forma estável.

Uma solução de ABTS 7mM (100 mL) foi misturada com solução de persulfato de potássio 2,45mM (100 mL) para gerar o radical ABTS•+, e mantida na ausência de luz por 16 horas antes do uso. Antes de cada ensaio, a solução foi diluída em álcool etílico até atingir absorvância de $0,7 \pm 0,05$ a 734 nm por meio de espectrofotômetro (Modelo UV2550, Shimadzu e Tóquio, Japão).

Para a construção da curva padrão de Trolox (ácido 6-hidroxi-2-5-7-8-tetrametilcromo 2-carboxílico) foram elaboradas soluções com concentrações de 100, 250, 350, 500, 650, 750, 800, 850 e 900 μ M diluídas em álcool etílico, as quais reagiram com a solução de radical ABTS•+ (na proporção de 10 μ L:1 mL, respectivamente) durante 6 minutos, e a absorvância foi lida à 734 nm.

As amostras de solução proteica reagiram com a solução de radical ABTS•+ (na proporção de 20 μ L:980 μ L, respectivamente) durante 6 minutos e foram lidas nas mesmas condições que as amostras da curva. O espectrofotômetro foi zerado com álcool etílico PA em

734 nm e o branco considerado será a solução de radical ABTS•+. Todas as amostras foram avaliadas em triplicata.

A atividade antioxidante foi expressa em Trolox equivalente ($\mu\text{mol TE/g}$ proteína da amostra) a partir da equação da reta ajustada para a curva do padrão Trolox, de acordo com a Equação 9:

$$AA = \frac{(((\text{Abs}_{734\text{nm}} \cdot a) + b) (\mu\text{mol TE}))}{(\text{mg de proteína})} \quad (9)$$

Sendo:

ABS734nm: absorbância da amostra leitura a 734 nm.

3.2.14 Método FRAP

A atividade antioxidante foi medida de acordo com o ensaio do poder antioxidante redutor férrico (FRAP) descrito por Benzie e Strain, (1996), com modificações de Arnous et al., 2002. Para realização do ensaio, uma alíquota de 200 μL de solução proteica foi adicionada ao tubo de ensaio de 10 ml, juntamente com 200 μL de solução de cloreto férrico 3mM. Os tubos permaneceram em repouso por 30 minutos em banho maria a 37 °C. Após, foi adicionado 3,6 mL da solução TPTZ nos tubos com as amostras e no branco, permaneceu em temperatura ambiente por 10 min em ambiente com ausência de luz para reação. A análise foi realizada em espectrofotômetro (Modelo UV2550, Shimadzu e Tóquio, Japão), zerando o espectro com o branco e depois de realizado a leitura das amostras em 620 nm. A Curva padrão (100-1000 $\mu\text{mol / L}$) foi expressa como FeSO_4 equivalente (l mmol / L).

A atividade antioxidante foi expressa em Trolox equivalente ($\mu\text{mol TE/g}$ proteína da amostra) a partir da equação da reta ajustada para a curva do padrão Trolox, de acordo com a Equação 10:

$$AA = \frac{(((\text{Abs}_{620\text{nm}} \cdot a) + b) (\mu\text{mol TE}))}{(\text{mg de proteína})} \quad (10)$$

Sendo:

ABS620nm: absorbância da amostra leitura a 620 nm.

3.2.15 Atividade anti-inflamatória

Este ensaio mediu a cloração da taurina como descrito por Wess, et. al. 1982. A mistura de reação foi realizada em tubo de ensaio de 10 ml e consistiu de 100 µL de HOCl (600 µmol / L), 100 µL de taurina (150 mmol / L) e amostras de 100 µL de solução proteica para um volume final de 1 mL de PBS (pH 7,4). A solução foi completamente misturada e incubada por 10 min à temperatura ambiente, seguido de 100 µL de potássio foi adicionado iodeto (20 mmol/L). Absorbância foi medida espectrofotometricamente em espectrofotômetro (Modelo UV2550, Shimadzu e Tóquio, Japão), contra uma referência (onde 100 µL de PBS substituiu a amostra de solução proteica e correspondeu à ocorrência de 100% HOCl) a 350 nm.

A atividade anti-inflamatória foi expressa em vitamina C (Ácido ascórbico) equivalente (µmol AC/g proteína da amostra) a partir da equação da reta ajustada para a curva do padrão vitamina C, de acordo com a Equação 11:

$$AI = \frac{(((Abs_{350nm} * a) + b) (\mu mol AC))}{(mg \text{ de proteína})} \quad (11)$$

Sendo:

ABS734nm: absorbância da amostra leitura a 350 nm.

3.2.16 Atividade antidiabética (inibição da α -amilase)

A atividade antidiabética foi avaliada pelo método de inibição de α -amilase de acordo com o método descrito por Yu et al. 2012. Foi misturada uma solução de 10 µL de enzima em água destilada (DW)), pré-misturada com 10 µL de solução de solução proteica (em DMSO 10%) e ou faseolamina controle positivo Após foi realizada incubação por 15 min, 500 µL de solução de amido a 1% em tampão de fosfato de sódio 20 mmol l⁻¹ (pH 6,9) foi adicionado para iniciar a reação. A reação foi realizada a 37,5 C por 5 min e encerrada pela adição de 600 µL de reagente DNS (1% de ácido 3,5-dinitrosalicílico, 12% de tartarato de Na-K em 0,4 mol l⁻¹ NaOH). A mistura da reação foi colocada em banho maria no ponto de ebulição por 15 min e, em seguida, resfriado até atingir temperatura ambiente.

A atividade de α -amilase foi determinada a 540 nm por um espectrofotômetro (Modelo UV2550, Shimadzu e Tóquio, Japão). Para todos os testes, o ensaio de inibição foi

realizado em triplicata. A atividade inibitória foi calculada pela seguinte equação: A atividade antidiabética foi expressa em IC 50 (porcentagem de inibição/mg proteína da amostra) de acordo com a Equação 12:

$$AD = \frac{(ABS540nm) - (ABS540nm \text{ Amostra})}{ABS540nm} \times 100 \quad (12)$$

Sendo:

ABS540nm: absorbância da amostra leitura a 540 nm.

3.2.17 Análise estatística dos resultados

Os resultados obtidos foram expostos à análise estatística através da Análise de Variância (ANOVA), seguido pelo teste de comparação de médias de Tukey, a 5% de significância.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Caracterização físico-química do CPS

O Concentrado proteico de soro de leite (CPS) com 35% de proteína foi diluído na proporção de 9% de carga proteica em 1000 mL de água destilada. As amostras foram caracterizadas em triplicata quanto à composição, descrita na Tabela 4. Os valores encontrados estão expressos em média com o desvio padrão ($P > 0,05$). As amostras foram coletadas de forma randomizadas para analisar sua composição.

Tabela 6 - Composição físico-química da solução de CPS utilizada na hidrólise proteica

Parâmetros	Concentração no CPS
Proteína (g/100g)	9,03±0,15
Gordura (g/100g)	1,00±0,02
Lactose (g/100g)	12,12±0,28
pH	3,99
Sais	0,01
°Brix	22,8
Sólidos totais (g/100g)	22,61±0,53

* 1. Resultados de média ± desvio padrão.

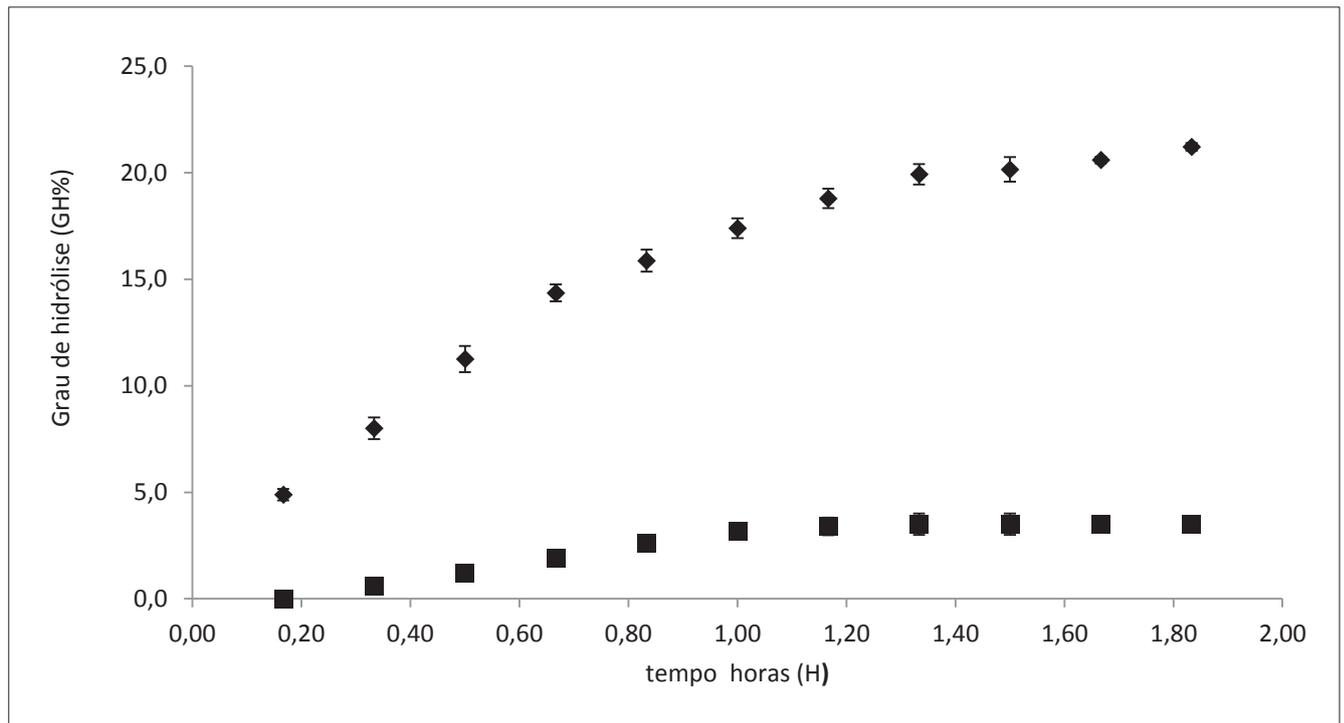
Fonte: elaborado pelo Autor, 2020

Os valores encontrados na Tabela 6 estão de acordo com o teorizado. Esses valores servem de apoio para avaliar o rendimento dos processos que foram analisados nas próximas etapas do trabalho como hidrólise, ultrafiltração, digestão e bioatividade.

3.3.2 Cinética enzimática do produto de hidrólise para produção de biopeptídeos

Os resultados da cinética do grau de hidrólise apresentados na Figura 9 foram calculados com média e Desvio Padrão para as enzimas utilizadas neste trabalho.

Figura 9 - Cinético do grau de hidrólise das proteínas do soro de leite



Fonte: elaborado pelo Autor, 2020

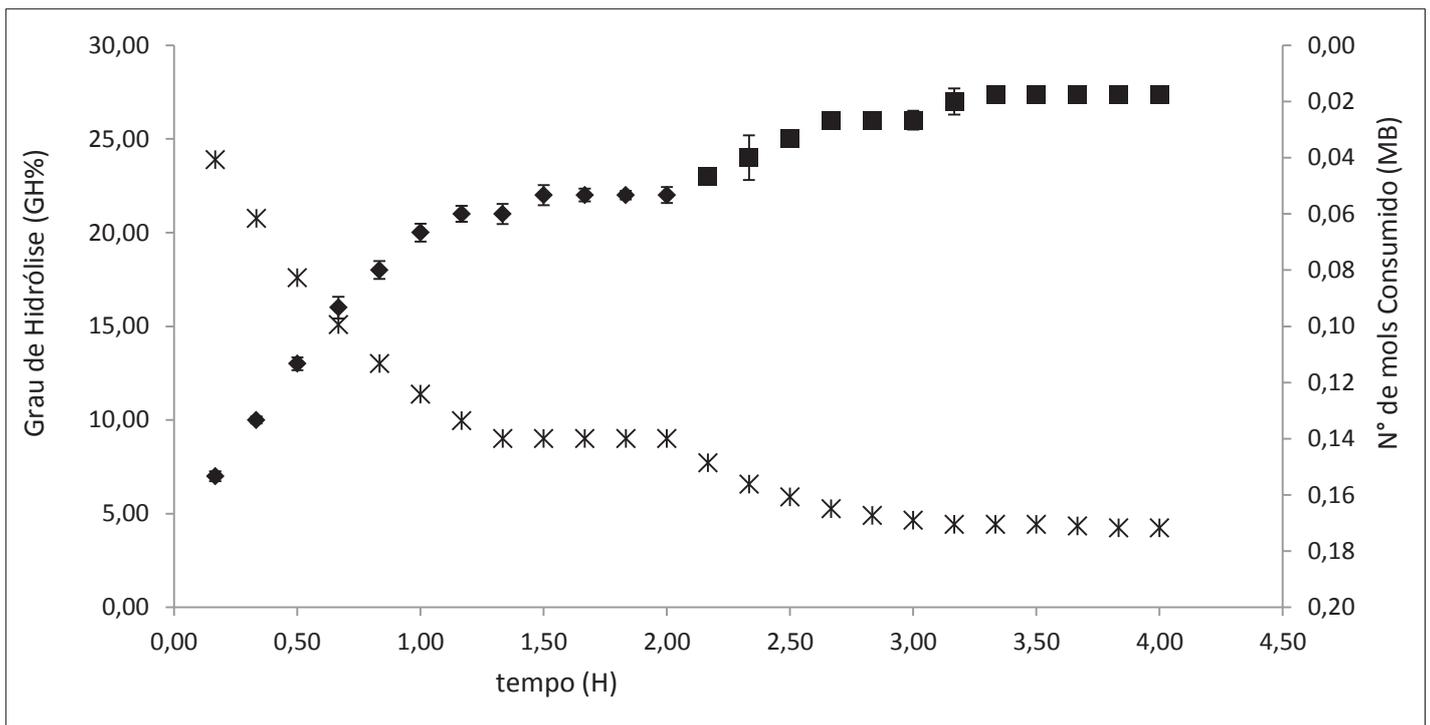
Legenda. (◆) Alcalase e (■) Neutrase.

Ao final do processo, o grau de hidrólise (GH) máximo (21,15%) alcançado com a enzima Alcalase. Até a primeira hora foi observado crescimento no GH, e após 1,5 horas foi atingido o platô. Com a enzima neutrase foi observado um GH de (3,5%), apresentando também maior avanço no GH na primeira hora e atingindo o plato após 1,2 horas de reação. Os valores de GH relatados na literatura utilizando condições de trabalho similares são bastante variáveis, O'Keeffe; FitzGerald, (2014), utilizando a Alcalase, Neutrase, Corolase PP e Flavourzyme observaram valores de grau de hidrólise, (20,5, 12,5, 12,1 e 11,4%) respectivamente. Corrochano et al., (2019) observaram GH menor que os resultados do nosso trabalho com a enzima Alcalase (13,60%) e superiores com a Neutrase (5,28%).

A Alcalase já foi relatada na literatura por possuir alto GH para diversos substratos proteicos. De acordo com Doucet et al., (2003), a atividade da Alcalase está relacionada à especificidade da enzima em hidrolisar proteínas em regiões com aminoácidos aromáticos (fenilalanina, Triptofano e Tirosina), alifáticos (Leucina e Alanina), resíduos de hidroxila (Serina), ácidos (Glutâmico) e contendo enxofre (Metionina) em regiões internas da proteína. A Neutrase é uma metaloendoprotease (XU et al., 2014) atua quebrando as ligações entre os aminoácidos leucina e fenilalanina (XU et al., 2014; O'KEEFFE, FITZGERALD, 2014).

Combinado as duas enzimas Alcalase e Neutrase, a cinética do GH está expressos em média com Desvio Padrão obtidos neste trabalho, conforme Figura 10. A Neutrase foi adicionada apos duas horas de reação para completar aumentar a hidrólise e agir em sinergismo com a Alcalase.

Figura 10 - Cinética do Grau de hidrólise das proteínas do CPS produto de hidrólise seqüencial pelas enzimas Alcalase e Neutrase



Fonte: elaborado pelo Autor, 2020.

Legenda. (◆) Alcalase e (■) Neutrase.

Aliando as duas enzimas (Alcalase e Neutrase) em reações sequenciais, conforme mostra a Figura 10, foi observado um aumento no grau de hidrólise (GH). A Alcalase sozinha atingiu um grau de hidrólise de 21,15%, e com a adição da Neutrase este valor aumentou para de 27,37%. A Alcalase manteve-se crescente a atividade proteolítica até 1,5 horas de reação, atingindo o platô e não havendo mais diferenças no grau de hidrólise. Após adição da Neutrase, no tempo de 2 h, ocorreu aumento novamente no GH. A hidrólise de duas enzimas em cinergismo pode aumentar significativamente o GH. Bu et al (2020) utilizaram a hidrólise sequencial com enzima Pancreáticas com a Protease A2SD e atingiram o grau de hidrólise máximo de 45,4% na hidrólise de proteínas do soro de leite. Por outro lado, a combinação de Alcalase com Protease A2SD e neutrase com Protease A2SD obtiveram grau de hidrólise <35%, mas inferior que a primeira combinação. Além disso,

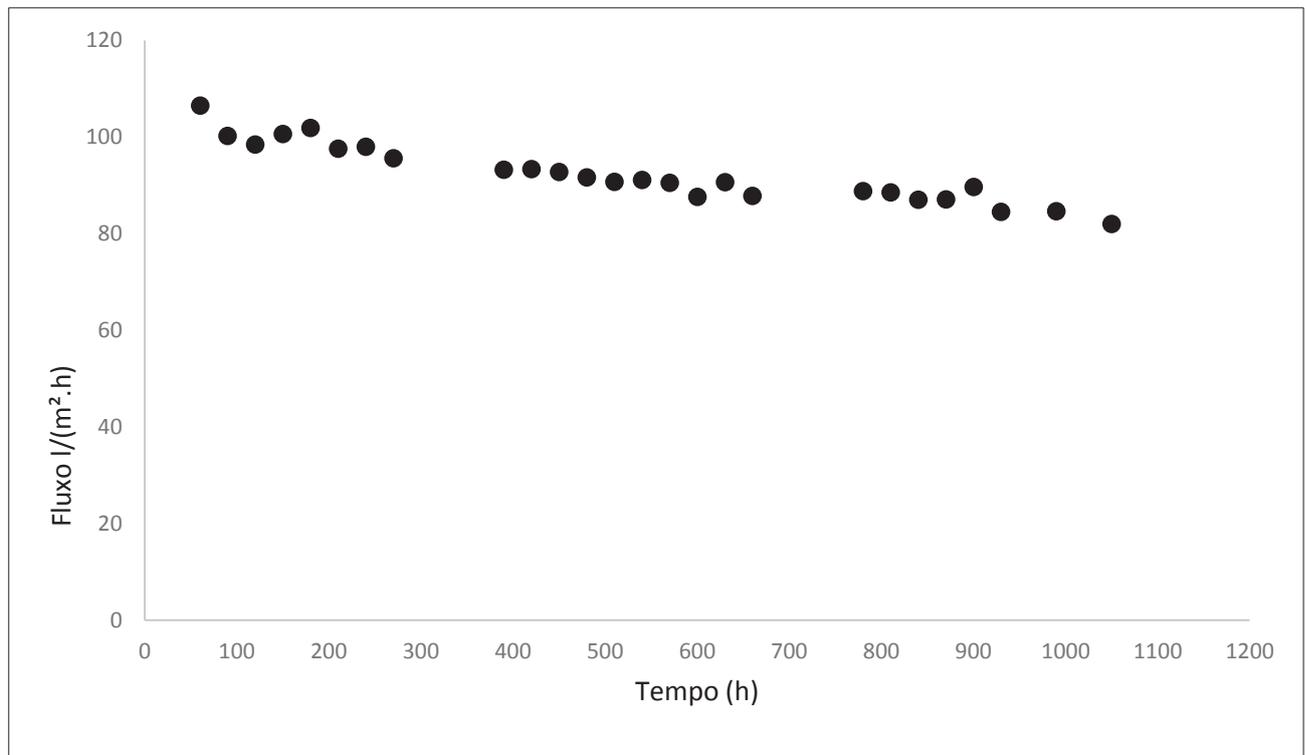
diferentes combinações de enzimas exibiram diferentes capacidades de clivagem de peptídeos e liberação de fenilalanina. A fenilalanina é apontada como composto alergênico do leite em pacientes portadores da doença fenilcetonúria. A combinação da Protease A2SD com as enzimas Thermoase, ou a Neutrase ou a Pancreatina liberaram 94,13%, 91,44% e 93,25% respectivamente de fenilalanina, provando que embora tenha um menor grau de hidrólise, o mecanismo da enzima de afinidade da neutrase por fenilalanina demonstra a indicação da enzima para diminuir composto potencial alergênico (BU et al, 2020), sendo indicado combinar hidrólise com a neutrase para diminuir os compostos alergênicos em pacientes com fenilcetonúria.

Outro fator que corrobora com o aumento da hidrólise foi o pré-tratamento térmico antes de iniciar a hidrólise enzimática, a temperatura desnatura e melhora a manipulação conformacional das proteínas globulares do soro de leite, auxiliando na a ação da enzima em quebrar as ligações peptídicas. Combinar enzimas proteolíticas aliadas a um tratamento térmico auxilia a produzir peptídeos com múltiplas propriedades funcionais (JOURNAN et al., 2015).

3.3.3 Ultrafiltração dos hidrolisados proteicos de soro de leite

Inicialmente foi realizado o processo de limpeza das membranas e repetido após cada UF, o sistema foi enxaguado com água por 5 minutos sem reciclo e com a válvula de pressão totalmente aberta, com o objetivo de remover a camada de depósito formada pela polarização por concentração. Após o enxágue, a permeabilidade da membrana foi medida novamente com água miliQ, conforme mostra a Figura 11.

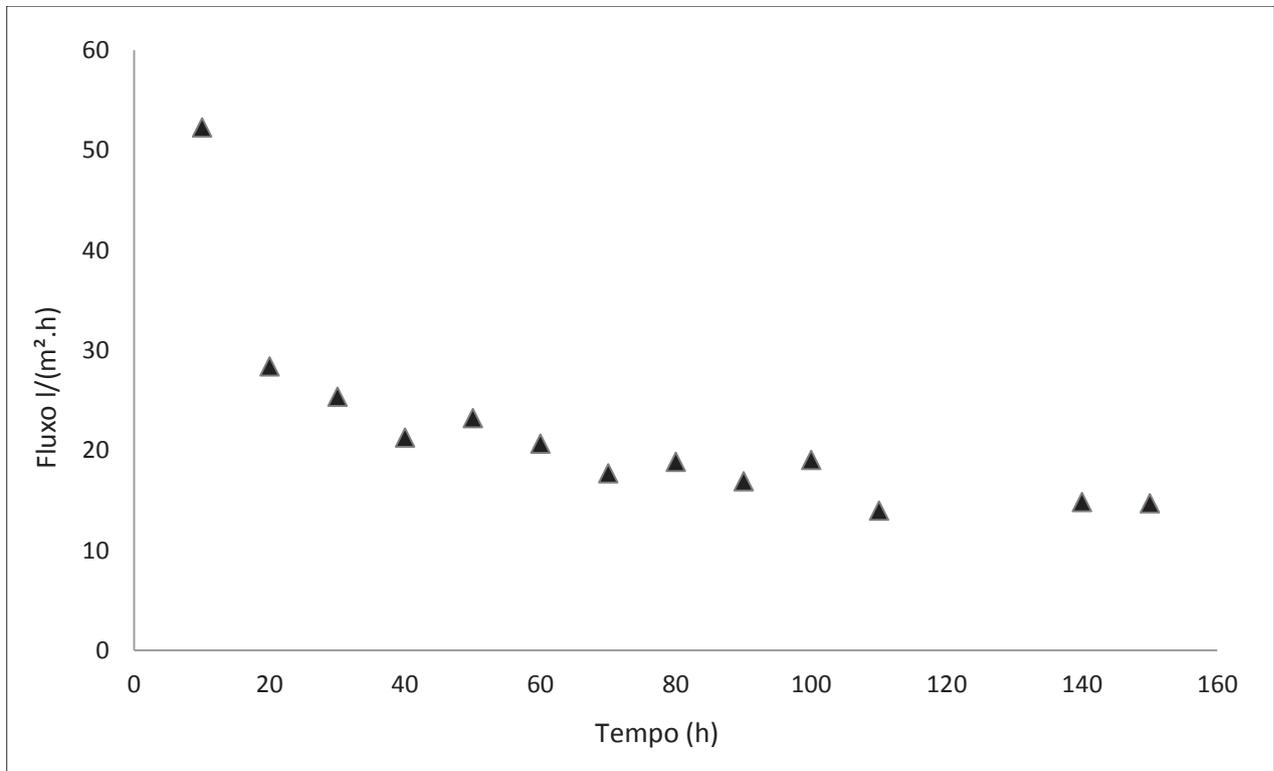
Figura 11 - Fluxo do permeado com soluto água miliQ, através da membrana de UF operando a 1 bar de pressão e 50°C de temperatura



Fonte: elaborado pelo Autor, 2020.

O fluxo inicial foi de 106,56 L/h.m² Figura 10, havendo um pequeno decréscimo ao longo do tempo e não redução abaixo de 82 L/h.m². O fluxo da membrana se manteve abaixo do valor de referência (150 a 250 L/h.m²) indicado pelo fabricante. A pressão para UF foi definida em 1 bar. Utilizando a pressão de 1 bar, fenômenos como polarização e incrustação são minimizados e o fluxo tem dependência mais linear com a pressão. Por este motivo, esta pressão foi definida como a pressão de trabalho para o processo de ultrafiltração.

Figura 12 - Fluxo permeado através da membrana de UF operando com solução proteica hidrolisada pelas enzimas Alcalase e Neutrase a 1 bar de pressão e 50°C de temperatura



Fonte: elaborada pelo Autor, 2020

O fluxo do permeado da solução hidrolisada Figura 12, foi iniciado com 52,308 L/h.m², capacidade menor que a água miliQ Figura 11, consequência do fenômeno de polarização por concentração, onde podem ser formadas zonas e/ou camadas de polarização que impedem ou dificultam a passagem da solução hidrolisada. Nestes momentos, as moléculas tendem a ficar retidas, enquanto a água flui com mais facilidade através dos poros da membrana, e conseqüentemente, a concentração proteica no permeado diminui. De acordo com Cheison, Wang e Xu (2007), altas taxas de recuperação de proteína no permeado estão intimamente relacionadas ao seu tráfego pela membrana e o GH elevado aumenta a permeação (LI POWER, et al., 2014; O'KEEFFE et al., 2017; ALONSO et al., 2018).

O fluxo de permeado é influenciado por vários fatores, como as características do substrato, as propriedades hidrodinâmicas, a pressão transmembrana, a geometria da membrana, as condições de processo e equipamentos (CHERYAN, 1998, GIRARD; FUKUMOTO, 2000, HABERT; BORGES; NÓBREGA, 2006).

A hidrólise enzimática combinada com a tecnologia de ultrafiltração permite a obtenção de peptídeos dentro de uma faixa de massa molecular, os peptídeos de alto peso

molecular são retidos, migrando no permeado os peptídeos <10kDa que exibem atividades biológicas (BARRY et al., 2017; POWER, et al., 2014; O'KEEFFE et al., 2017; ALONSO et al., 2018) e contribuindo com a redução de compostos alergênicos (BU et al., 2020). Essa caracterização será abordada na sequência.

3.3.4 Caracterização físico-química e molecular dos peptídeos do soro de leite

A fim de avaliar a efetividade do processo (Tabela 7), a composição físico-química da alimentação, permeado e retido do hidrolisado proteico de soro de leite foi avaliada quanto à suas concentrações de proteína, nitrogênio livre, gordura, lactose e sólidos totais

Tabela 7 - Caracterização Físico-química de solução hidrolisada de CPS por Alcalase e Neutrase, e do retido e permeado obtidos na ultrafiltração da solução

Amostras	Proteínas totais (%)	Gordura (%)	Lactose (%)	Sólidos totais (%)	°Brix	pH	Cz% (m/m)
Alimentação	9,23 ±0,01	1,03 ±0,02	12,96 ±0,28	23,46 ±0,02	22,3	8,5	n.d.
Retido	4,93 ±0,007	0,83 ±0,02	5,7 ±0,28	12,4 ±0,01	15,6	7,94	0,04
Permeado	4,59 ±0,02	0,21 ±0,007	5,84±0,23	11,51 ±0,08	13,8	8,43	0,05

* 1. Resultados de média ± desvio padrão; n.d : não determinado;

Fonte: elaborado pelo Autor, 2020

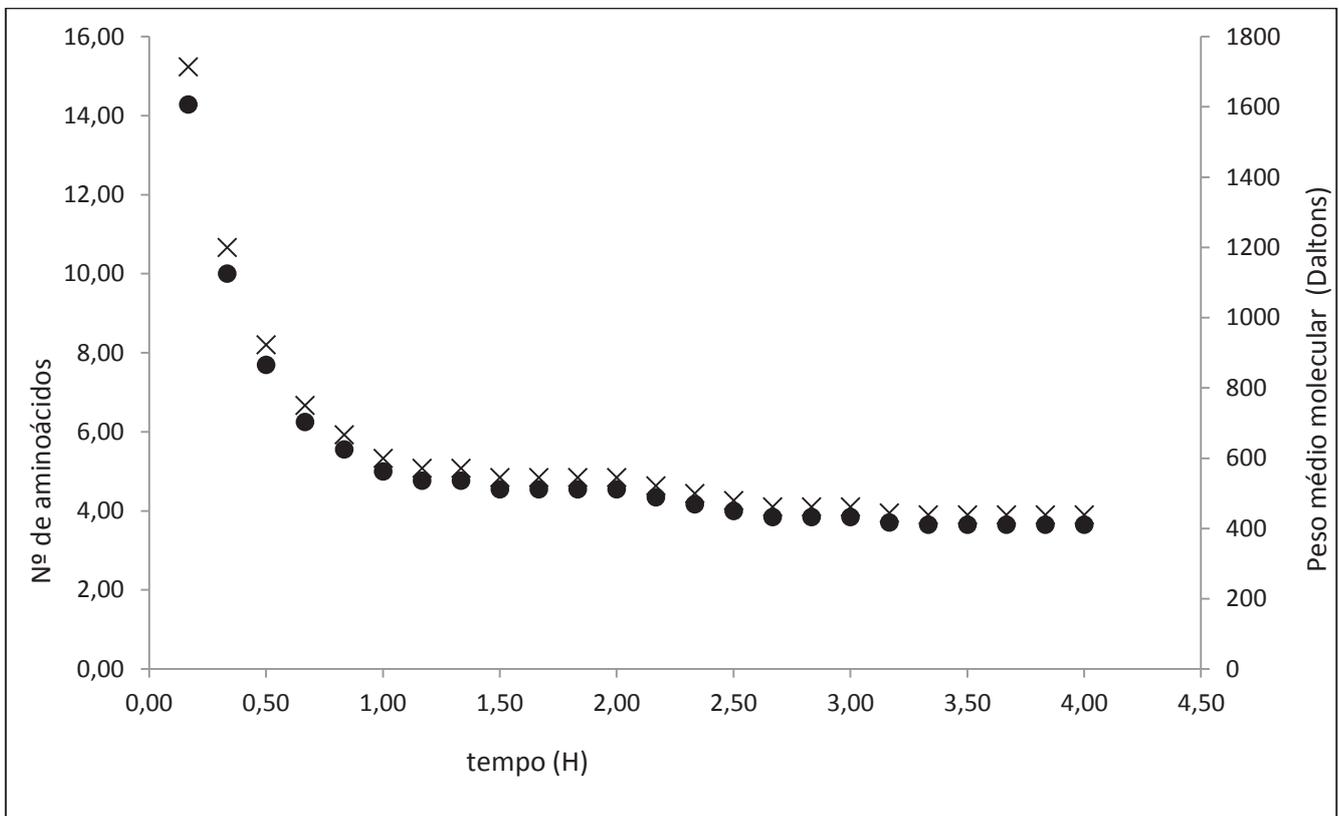
A composição de proteínas na alimentação foi distribuída pelas correntes de retido e permeado (Tabela 7). O soro possui proteínas de alto peso molecular, maiores que o tamanho dos poros das membranas, o resultado sugere que algumas proteínas têm mais de 10 kDa, não sendo possível a permeação pelos poros da membrana. Barry et al., (2017) utilizaram a combinação da Neutrase e Alcalase e observaram que um grau de hidrólise de 19 % e observou aumento significativo de permeação através de uma membrana de UF de 50 kDa. .

Nos resultados para lactose e gordura, observa-se separação após ultrafiltração. A lactose teve distribuição cerca de 50% de teor nas correntes retido e permeado. O teor de gordura permaneceu em maior concentração na corrente retido, porém uma pequena fração esteve presente no permeado. Pelo diâmetro de corte da membrana, maior parte da gordura deveria ficar retida, porém uma pequena quantidade de gordura no soro de leite deve estar na

forma de gordura livre, conseguindo permear pelo poro da membrana (MULDER E WALSTRA, 1974). Portanto, menos gordura foi transferida através da membrana.

Os hidrolisados obtidos em diferentes estágios da hidrólise enzimática por Alcalase + Neutrase ultrafiltrados e após digestão simulada foram caracterizados quanto ao comprimento médio das cadeias dos peptídeos formados de acordo com a Equao 3. Os resultados foram expressos em número de resíduos de aminoácidos; e o conforme Equao 4 o peso molecular médio, em Daltons, conforme descrito na Tabela 8. A Figura 13 apresenta o perfil molecular dos peptídeos ao longo do tempo de hidrólise.

Figura 13 - Caracterizao molecular de biopeptídeos do CPS obtidos por hidrólise sequencial Alcalase + Neutrase.



Fonte: elaborado pelo Autor, (2020).

Legenda. CMC N de Aminoácidos (), PMM em Daltons (x)

Tabela 8 - Caracterização molecular de biopeptídeos do CPS obtidos por hidrólise sequencial.

Amostra	GH	Comprimento médio das cadeias (Nº de resíduos)	Massa molecular média (Da)
A+N (D)	7,60	13,16	1579,55
A+N total	34,97	2,86	343,151
CPS (D)	17,39	5,75	690

Legenda: A+N (D): Alcalase + Neutrase fase pós-digestão; A+N (T): Alcalase + Neutrase somatório digestão e hidrólise; CPS: Concentrado proteico do soro de leite pós-digestão.

Fonte: elaborada pelo Autor, 2020

Com o tempo de reação, à medida que aumentou o GH ocorreu um decréscimo progressivo no comprimento das cadeias (CMC) e na massa molecular média (MMM) Figura 9. O CMC de 4,38 indica que, em média, os peptídeos formados são tetrapeptídeos com aproximadamente 4 a 5 aminoácidos e com MMM de 438,46 Da. Os resultados da digestão do CPS, Tabela 8, apresentaram peso molecular superior a proteína hidrolisada previamente pós-digestão, CMC de 5,75 e MMM 690 Da, presumindo que foram liberados em média peptídeos <1kDa e hidrolisados por Alcalase + Neutrase previamente um CMC 2,86 e MMM de 343,513 em média, liberou sequencias de trí e dípeptídeos com aproximadamente 3 aminoácidos Da. Lorenzetti et al., (2020), utilizando o pré tratamento com ultrassom, hidrólise enzimática previamente e submetido os hidrolizados da digestão, encontraram perfil de peptídeos similares ao nosso trabalho, com 199; 205; 274; 357 e 371 Da. Após a hidrólise e digestão gastrointestinal ocorre um aumento de peptídeos gerados, mesmo para amostras antes previamente hidrolisados.

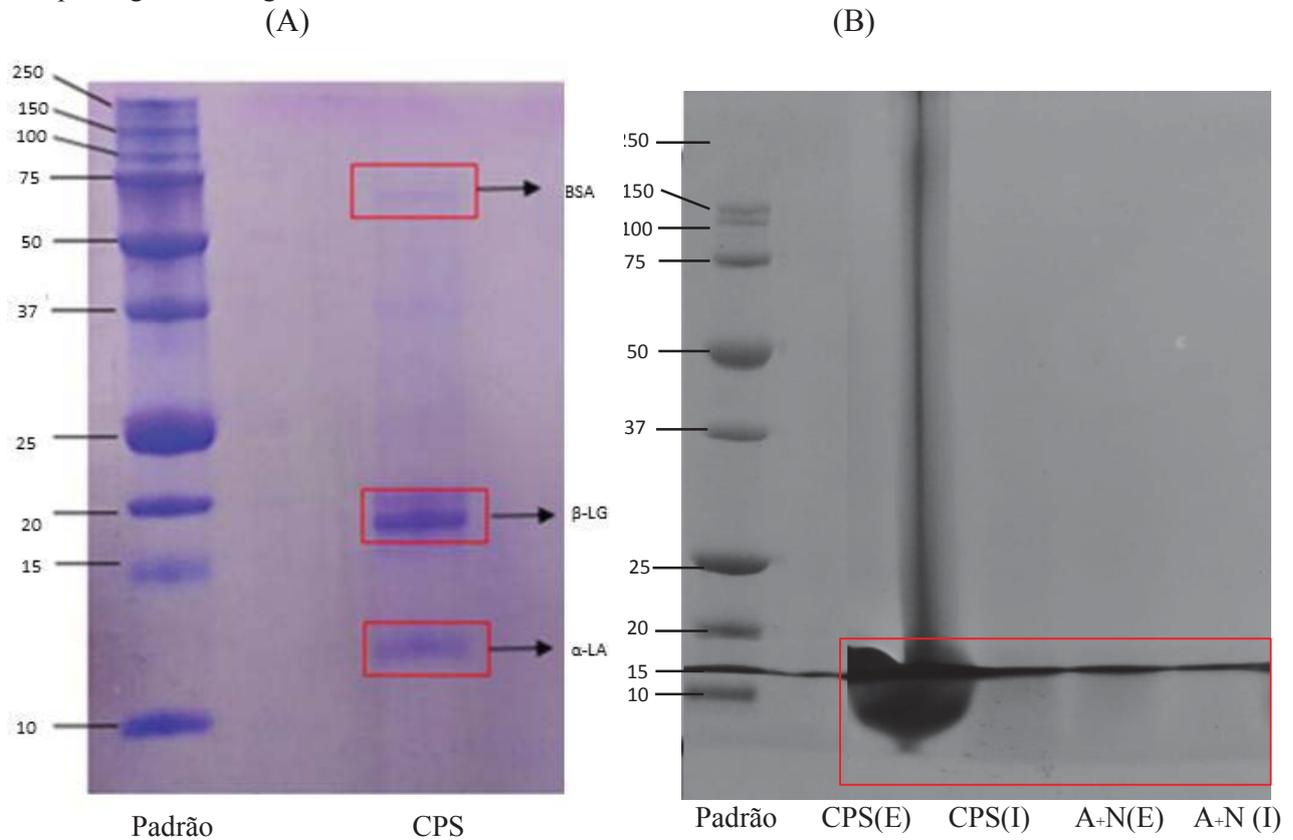
Após a digestão intestinal, foi observado um GH máximo de (17,39%) com o soro de leite concentrado, superiores a Conway et al., 2013, que observaram (8,2%) de GH após 2 h de digestão com pepsina seguida por 3 h de tratamento com tripsina, porém inferiores a Power Grant et al., (2015), observaram um GH de (32%) após digestão com o soro de leite. Com a hidrólise sequencial foi possível obter um GH máximo de (27,37%), + (7,6%) de digestão foi observado um GH máximo de (34,97%) no total. Se considerarmos apenas a digestão, o soro de leite concentrado teve maior GH, pois as proteínas estavam na sua forma íntegra, mostrando que o processo de hidrólise e ultrafiltração pode facilitar o trabalho do sistema digestório diminuído o tamanho dos peptídeos (GALLEGO et al., 2020).

O interesse na obtenção de pequenos peptídeos, di, tri- e tetrapeptídeos, está relacionado à sua biodisponibilidade, uma vez que podem ser capazes de sobreviver à digestão gastrointestinal, além de melhorar suas atividades biológicas. A absorção de

aminoácidos acontece via transporte ativo secundário de sódio, os peptídeos compostos por 2 ou 3 aminoácidos, absorvidos via transporte ativo secundário, baseado no gradiente de hidrogênio ionizado ou transportador PepT1 (WIDMAIER et al., 2013). Na presença do aminoácido prolina, esses peptídeos, podem passar o sistema digestório sem sofrer degradação. Lorenzetti et al., (2020), conclui que a carga proteica continua a mesma após a digestão, os peptídeos podem chegar disponíveis para absorção no íleo, mantem sua atividade biológica, ocorrendo apenas uma diminuição do peso molecular, sendo encontrados em maior quantidade di e tri peptídeos, o que podem melhorar a atividade biológica.

As Figuras 14A e 14B ilustram o perfil eletroforético dos peptídeos obtidos no processo. Para comparação, foi realizada simulação gastrointestinal da solução proteica de soro de leite sem passar pela hidrólise e ultrafiltração. Analisando as amostras não hidrolisadas, na Figura 14 A, observa-se a presença de duas bandas intensamente coradas, que correspondem às frações β -lactoglobulina (18 kDa) e α -lactoalbumina (14 kDa), proteínas mais abundantes do soro, aparece ainda algumas caseínas (25 a 36 kDa) remanescentes do processo de fabricação do queijo com bandas bem claras. Por outro lado, na Figura 14 B, as bandas da β -lactoglobulina e α -lactoalbumina não são mais observadas, mostrando que hidrólise reduziu a massa molar da solução. Adicionalmente, não são observadas outras marcações acima de 10 kDa para qualquer faixa após a digestão (tanto para o CPS sem hidrólise como para o hidrolisado). Essa Figura leva à reflexão que o trato gastrointestinal é muito eficiente para digestão das proteínas do soro de leite, de modo que somente visualiza-se marcações abaixo de 10 kDa na Figura 14B.

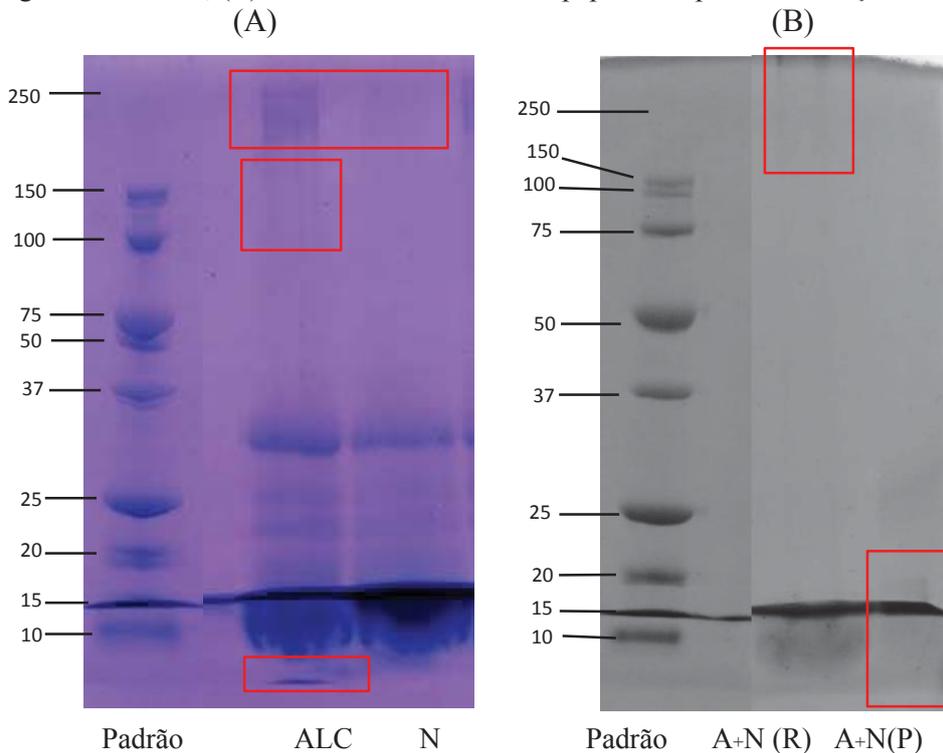
Figura 14 - (A) Perfil eletroforético dos marcadores padrão (10-250 kDa) e do CPS em gel Tris-Tricina; (B) Perfil eletroforético Peptídeos do CPS Intacta pós digestão e Hidrolisados A+N permeado pós digestão em gel Tris-Tricina



Legenda: CPS: Concentrado proteico de soro de leite; CPS (E): Concentrado proteico de soro de leite após a passagem pelo estomago; CPS (I): Concentrado proteico de soro de leite após o intestino; A+N (E): Alcalase + Neutrase fase fase estomago; A+N (I): Alcalase + Neutrase fase fase intestinal.

Fonte: Elaborada pelo Autor, 2020

Figura 15 - (A) Perfil eletroforético dos marcadores padrão (10-250 kDa) e do CPS hidrolisado em gel Tris-Tricina; (B) Perfil eletroforético dos peptídeos após ultrafiltração em gel Tris-Tricina.



Legenda: ALC: Alcalase; N: Neutrase; A+N (R): Alcalase + Neutrase Retido; A + N (P): Alcalase + Neutrase Permeado.

Fonte: Elaborada pelo Autor, 2020

Para os hidrolisados obtidos pela Alcalase Figura 15 A, observa-se um aparecimento das bandas proteicas com massa molecular abaixo de 10 kDa, indicativo que seja peptídeos com peso molecular de 1 a 2 kDa. Essa banda não está visível com hidrolisados pela enzima Neutrase Figura 15A, o baixo grau de hidrólise da Neutrase, produz poucos peptídeos de baixo peso molecular, não sendo possível visualizar na eletroforese, o contrário ocorre com a Alcalase produzindo maior quantidade de peptídeos de baixo peso molecular, comprovado pelo alto GH da Alcalase Figura 9. O método eletroforético detecta cadeias polipeptídicas maiores que 1 kDa, e provavelmente não foi possível visualizar os peptídeos gerados abaixo desse valor. Em virtude de a Alcalase ser uma enzima com ampla ação e pouca seletividade, é possível que tenha gerados peptídeos de diferentes pesos moleculares, não sendo possível a visualização destes pela sua baixa concentração (PESSATO et al., 2016). Na Figura 15B é possível também observar a diferença do perfil de peptídeos após realizar a hidrólise sequencial pela ação da Alcalase+Neutrase e submeter ao processo de Ultrafiltração. Após Ultrafiltração, os peptídeos do permeado de peso molecular entre 100 a 250 kDa não aparecem na eletroforese, sendo possível observar peptídeos exclusivamente de peso

molecular menor que 10 kDa, enquanto que na corrente de retido observa-se uma banda >100 kDa, comprovando a migração de peptídeos de baixo peso molecular pela ultrafiltração.

A Figura 14B apresenta os resultados da digestão gastrointestinal simulada. Na digestão do concentrado proteico de soro de leite (CPS), após a passagem pelo estômago, nota-se intensa coloração nas bandas β -Lg (18 kDa) e α -La (14 kDa), indicando menor grau de hidrólise dessas proteínas. A β -lactoglobulina é relatada por outros trabalhos (SOUSA et al., 2020; Ozório, 2020) como sendo resistente a enzima gástrica pepsina e rapidamente hidrolisada na fase intestinal. A formação de bandas de peptídeos na faixa de 1 kDa em pequena proporção, mostram que houve pequena intensidade de hidrólise proteica, inclusive em relação às caseínas, no topo do gel às frações.

Ao final da fase intestinal 14B, nenhuma banda está visível acima de 10 kDa, com hidrólise sequencial digerida e soro de leite digerido. Sousa et al., (2020) não encontrou nenhuma proteína intacta na eletroforese e espectrometria de massa do soro de leite digerido utilizando o mesmo protocolo de digestão infogest.

Durante a digestão estática simulada ocorre alterações moleculares nas proteínas nativa do soro de leite e os compostos como os peptídeos presos à estrutura proteica são liberados para realizar sua atividade biofuncional, OZÓRIO et al., (2020) caracterizou cerca de 198 peptídeos liberados durante o processo de digestão.

A digestão alimentar, algumas vezes é apontada como tóxica para células Caco-2 e HT-29 (LE MAUX et al., 2013), o estudo de Corrochano et al., (2018) demonstra o contrário, utilizando as proteínas do soro de leite após digestão simulada foi observado que a bioatividade de β -lactoglobulina e α -lactalbumina protegem as células humanas HT-29 do dano causado por radicais livres, a lactoferrina aumentou significativamente a quantidade de superóxido dismutase 1, 2 e tioredoxina que são enzimas antioxidantes intracelulares. Todas as amostras apresentam atividade inibidora da DPP-IV.

3.3.5 Atividade biológica de peptídeos do soro de leite

A atividade antioxidante (ABTS e FRAP) dos biopeptídeos está expressa em $\mu\text{mol TE/g}$ de proteína para atividade antioxidante, $\mu\text{mol AC/g}$ de proteína com atividade anti-hipoclorito e atividade da enzima α -amilase expresso em inibição de 50% da atividade da enzima (IC_{50}/g de proteína/mL) conforme mostra a Tabela 9. As amostras hidrolisadas

mostraram aumento na atividade antioxidante quando comparadas com o CPS não hidrolisado. As amostras líquidas foram diluídas 50 vezes para leitura no espectro.

Tabela 9 - Atividade biológica do soro de leite concentrado, peptídeos obtidos pela hidrólise e volume do retido e permeado

	CPS	ALC	N	AN (R)	AN (P)
ABTS	17,45 ±1,48	56,81±1,04	23,01±1,71	37,74±2,77	74,04±2,61
FRAP	3,12±0,23	15,99±2,92	12,73±1,15	12,70±1,87	8,34±0,68
Anti HOCl	42,33±12,7	92,24±18,45	48,14±2,46	123,78±9,68	103,62±2,58
α -Amilase	0,73±0,02	0,37 ±0,01	0,36±0,01	0,85±0,03	0,15±0,09

* 1. Resultados de média ± desvio padrão; Legenda: CPS: concentrado proteico do soro de leite; ALC: Alcalase; N: Neutrase; A + N (R): Alcalase + Neutrase retido; A + N (P): Alcalase + Neutrase permeado;

Fonte: elaborada pelo Autor, 2020.

A atividade biológica dos peptídeos do soro de leite conforme Tabela 8, exibiram aumento de ação antioxidante (ABTS e FRAP) em todas as amostras hidrolisadas quando comparadas com a proteína íntegra. As amostras de hidrolisado de Alcalase apresentou resultados de inibição superiores a Neutrase, cerca de 2x maior capacidade de eliminação do radical ABTS+ e ação Anti HOCl. Com o ensaio poder redutor férrico FRAP os hidrolisados de Alcalase apresentaram (15,99±2,92 μmol de TE/g de proteína mL^{-1}) e com a Neutrase (12,73±1,15 μmol de TE/g de proteína mL^{-1}). Avaliado a atividade antidiabética foi observado diferenças nos valores de inibição de 50% da atividade da enzima α -amilase (IC_{50}) tratada com o soro de leite concentrado (proteína intacta) IC_{50} (0,73±0,02 g de proteína mL^{-1}), que apresentaram melhora na atividade anti- α -amilase com os hidrolisados da Alcalase IC_{50} (0,37±0,01 g de proteína mL^{-1}) e também observado valores muito próximos com os hidrolisados da Neutrasa IC_{50} (0,36±0,01 g de proteína mL^{-1}).

Avaliado atividade bioativa da solução hidrolisada de Alcalase + Neutrase Ultrafiltrada, a corrente retido apresentou valores superiores de ação antioxidante pelo método FRAP (12,73±1,15 μmol de TE/g de proteína mL^{-1}) em relação ao permeado (8,34±0,68 de μmol TE/g de proteína mL^{-1}). A atividade anti HOCL apresentou efeito inibidor superior com a corrente retido (123,78±9,68 μmol de AC/g de proteína mL^{-1}) em relação ao permeado

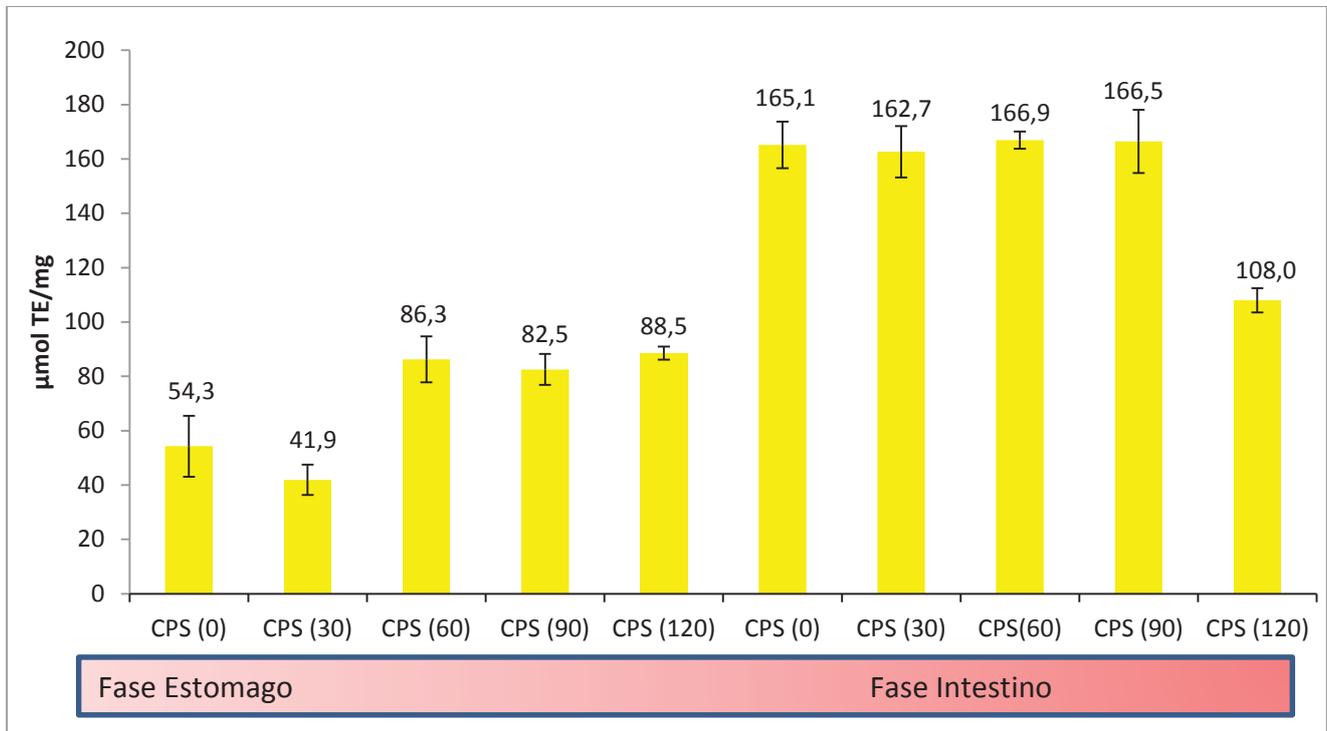
(103,62±2,58 μmol de AC/g de proteína mL^{-1}). A análise da atividade anti- α -amilase apresentou melhora na ação inibidora da enzima com a corrente permeado IC_{50} (0,15± 0,09 g de proteína mL^{-1}) em relação ao retido IC_{50} (0,85±0,03 g de proteína mL^{-1}). A Alcalase apresentou atividade FRAP (15,99±2,92 μmol de TE/g de proteína mL^{-1}) superior as correntes retido (12,7±1,87 μmol de TE/g de proteína mL^{-1}) e permeado μmol de (8,34±0,68 TE/g de proteína mL^{-1}). Esses resultados sugerem que, para as condições de substrato, enzima e relação enzima:substrato utilizadas neste trabalho, podem haver um GH crítico a partir do qual a atividade biológica é pouco ou negativamente influenciada e que pode não ser necessário uma extensa hidrólise para a formação de peptídeos com potencial biológico para determinadas atividades, como no caso do retido de Alcalase adição de Neutração superior ao permeado. O baixo peso molecular é importante para melhora do efeito biológico, porém a sequência de aminoácidos é fator primordial para que ocorra o efeito funcional (BAMDAD et al., 2017; CHEUNG et al., 2012).

De acordo com Corrochano et al., 2019, foi observado que os hidrolizados utilizando a enzima Alcalase apresentaram maiores resultados de atividade antioxidante que a proteína íntegra pelo método FRAP (26,96 ± 1,18 μmol de TE/g de pó), inibição do radical ABTS (76,41 ± 2,67%) e por ensaio ORAC (737,36 ± 67,24 μmol de TE/g de pó), proteína do soro íntacta por FRAP (3,81 ± 0,46 μmol de TE/g de pó, de inibição do radical ABTS (6,98 ± 0,18% μmol de TE/g de pó) e por ORAC (128,74 ± 48,36 μmol de TE/g de pó). Os hidrolizados por neutrase apresentaram atividade antioxidante 3x menor por inibição do radical FRAP e ORAC e 2x menor para inibição.

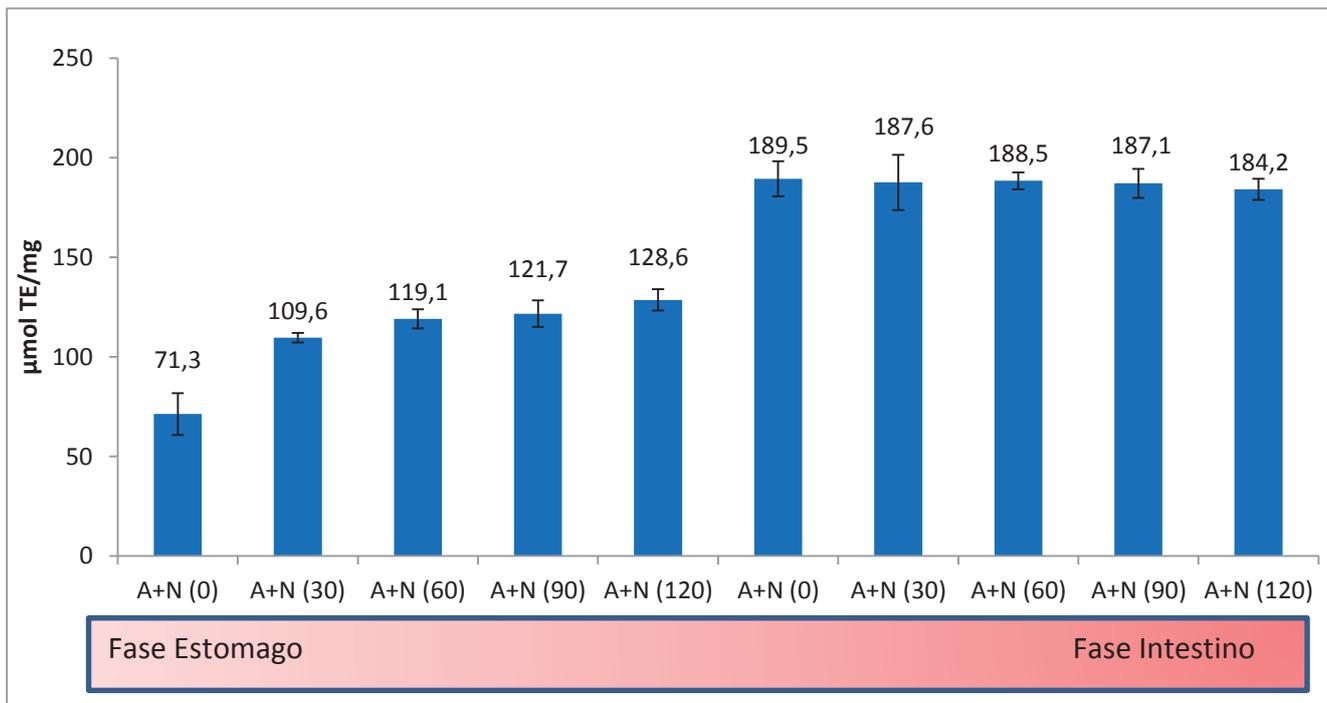
Após ingerir o alimento via oral, os peptídeos são submetidos à ação de enzimas proteolíticas que podem aumentar o GH (GALLEGO et al., 2020). O modelo de digestão empregado neste trabalho é um modelo estático *in vitro*, padronizado do INFOGEST, que simula o trânsito gastrointestinal (MIKENUS et al., 2014). As amostras de soro de leite íntacto e hidrólise sequencial foram submetidas a processo de digestão gástrica e íntestinal. Os resultados da atividade antioxidante conforme Figura 16 método ABTS e Figura 17 método FRAP foram expressos em μM de trolox equivalente/g de proteína mL^{-1} no decorrer do tempo de digestão.

Figura 16 - Atividade Antioxidante pelo ensaio ABTS de peptídeos do CPS no decorrer da digestão A) peptídeos do CPS B) permeado de hidrólise com A+N

A)



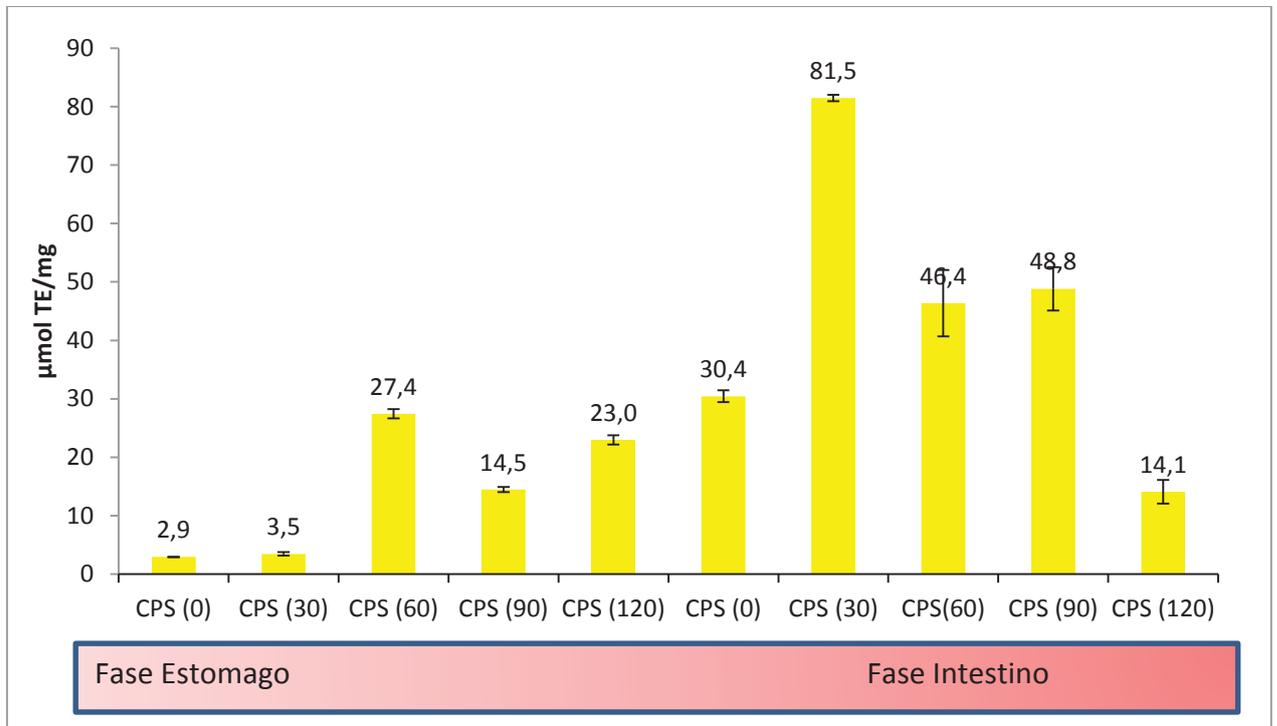
B)



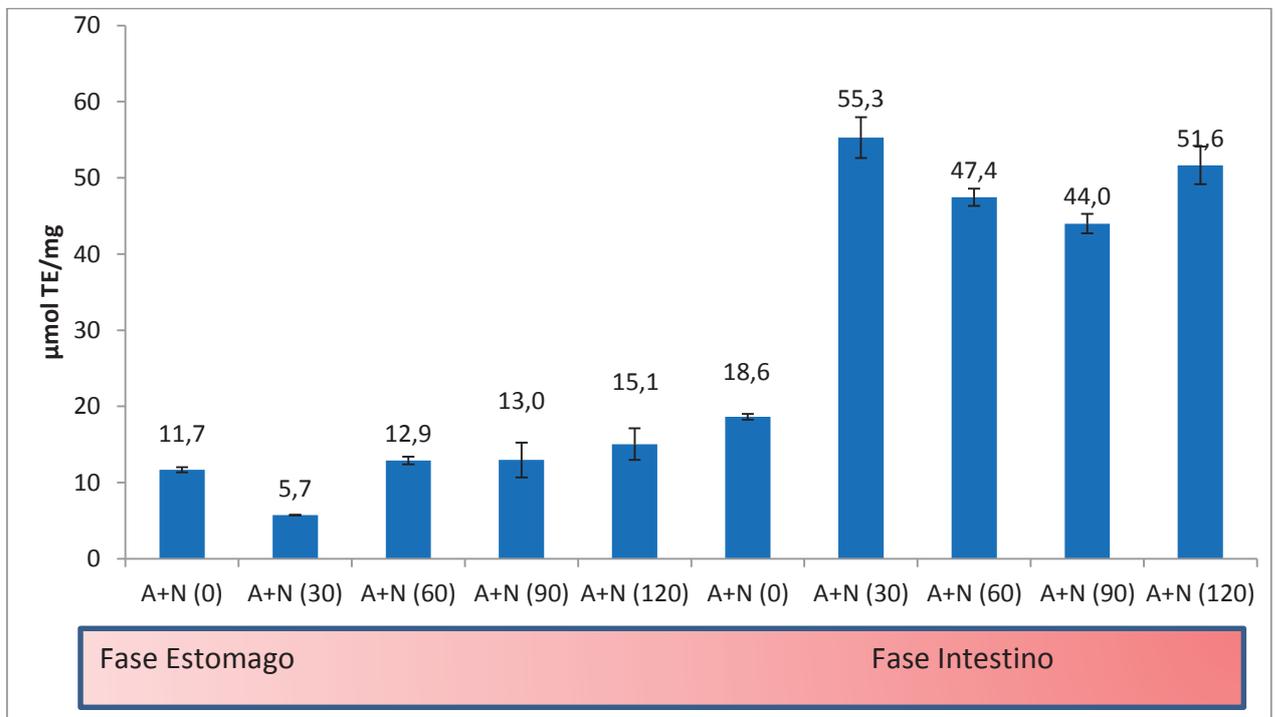
* 1. Resultados de média \pm desvio padrão; Legenda: A + N: Alcalase + Neutrase permeado; WPC. Soro de leite concentrado.

Fonte: elaborado pelo Autor, 2020.

Figura 17 - Atividade antioxidante, pelo ensaio FRAP, de peptídeos do CPS no decorrer da digestão
 A) peptídeos do CPS B) permeado de hidrólise com A
 A)



B)



1. Resultados de média \pm desvio padrão; Legenda: A + N: Alcalase + Neutrase permeado; WPC. Soro de leite concentrado.

Fonte: Elaborada pelo Autor, 2020.

Após o processo de digestão, as amostras de soro de leite intacto e permeado de hidrolisados do soro por Alcalse + Neutrased, exibiram alteração na atividade antioxidante. Avaliado pelo método ABTS, a proteína íntegra do CPS apresentou ($88,52 \pm 2,45$ μmol de TE/g de proteína mL^{-1}) amostra avaliada no final da etapa do estomago, e aumento da atividade no final da etapa íntestino ($108 \pm 4,41$ μmol de TE/g de proteína mL^{-1}). O mesmo foi observado pela amostra de permeado da amostra hidrolisada por Alcalase e Neutrased, ($128,61 \pm 5,35$ μmol de TE/g de proteína mL^{-1}) no final da fase estomago e seguiu aumentando a atividade após final da etapa íntestino ($184,2 \pm 5,22$ μmol de TE/g de proteína mL^{-1}). Pelo método FRAP, a proteína íntegra do CPS apresentou ($30,43 \pm 1,01$ μmol de TE/g de proteína mL^{-1}) amostra avaliada no final da etapa do estômago, e reduziu metade da atividade ($14,1 \pm 2,01$ μmol de TE/g de proteína mL^{-1}), no final da etapa íntestino. O contrário foi observado pela amostra de permeado de hidrolisados pela Alcalase + Neutrased, ao final da fase estômago ocorreu aumento do efeito inibitório ($15,1 \pm 2,08$ μmol de TE/g de proteína mL^{-1}) e aumentou cerca 3x a atividade após final da etapa íntestino ($51,63 \pm 2,45$ μmol de TE/g de proteína mL^{-1}). A *digestão in vitro* melhora a atividade antioxidante tanto para o CPS proteína íntacta quanto hidrolisada previamente. A Alcalase é apontada como poderosa em produzir peptídeos com ação antioxidante se comparada com os produtos de hidrólise por enzimas digestivas individualmente como Pancreatina, Papaína, Pepsina, Protease e Tripsina, assim como as enzimas comerciais como a Esperase, Flavourzyme, Neutrased, (KIM et al. 2007). A hidrólise sequencial Alcalase+Neutrased aliado ao processo de Ultrafiltração, melhorou significativamente a ação antioxidante de peptídeos do soro de leite após digestão, pois padroniza os peptídeos em tamanho <10 kDa. Esses resultados estão de acordo com POWER-GRANT et al. (2015), avaliaram a atividade antioxidante do CPS pós-digestão e observaram valores de inibição do hidrolisado superior a proteína íntacta. Valores encontrados com proteína íntacta antes da digestão ($136,62 \pm 10,18$ μmol de TE/g de pó) soro de leite hidrolisado GH 32% ($373,91 \pm 22,98$ μmol de TE/g de pó) e com o aumento do GH 45%, ocorreu melhora no efeito antioxidante ($776,92 \pm 14,4$ μmol de TE/g de pó). Com o soro de leite previamente hidrolisado e digerido GH 32% ($444,89 \pm 20,64$ μmol de TE/g de pó) e GH de 45% condições gástricas exibiu ($606,13 \pm 45,40$ μmol de TE/g de pó) pelo método ORAC. A hidrólise com Alcalase combinada com a Neutrased, submetida à digestão, aumenta a atividade antioxidante. De acordo com Corrochano et al (2019), a atividade antioxidante avaliada pelo método FRAP e ABTS, os peptídeos do soro do leite liberados por hidrólise de Alcalase, Neutrased e Bromelaina pós digestão teve uma diminuição na atividade antioxidante.

Nossos resultados ocorreram o contrário, uma possível explicação é que a hidrólise com combinações de enzimas aliado ao processo de ultrafiltração, melhoram significativamente a atividade funcional de peptídeos pós-digestão.

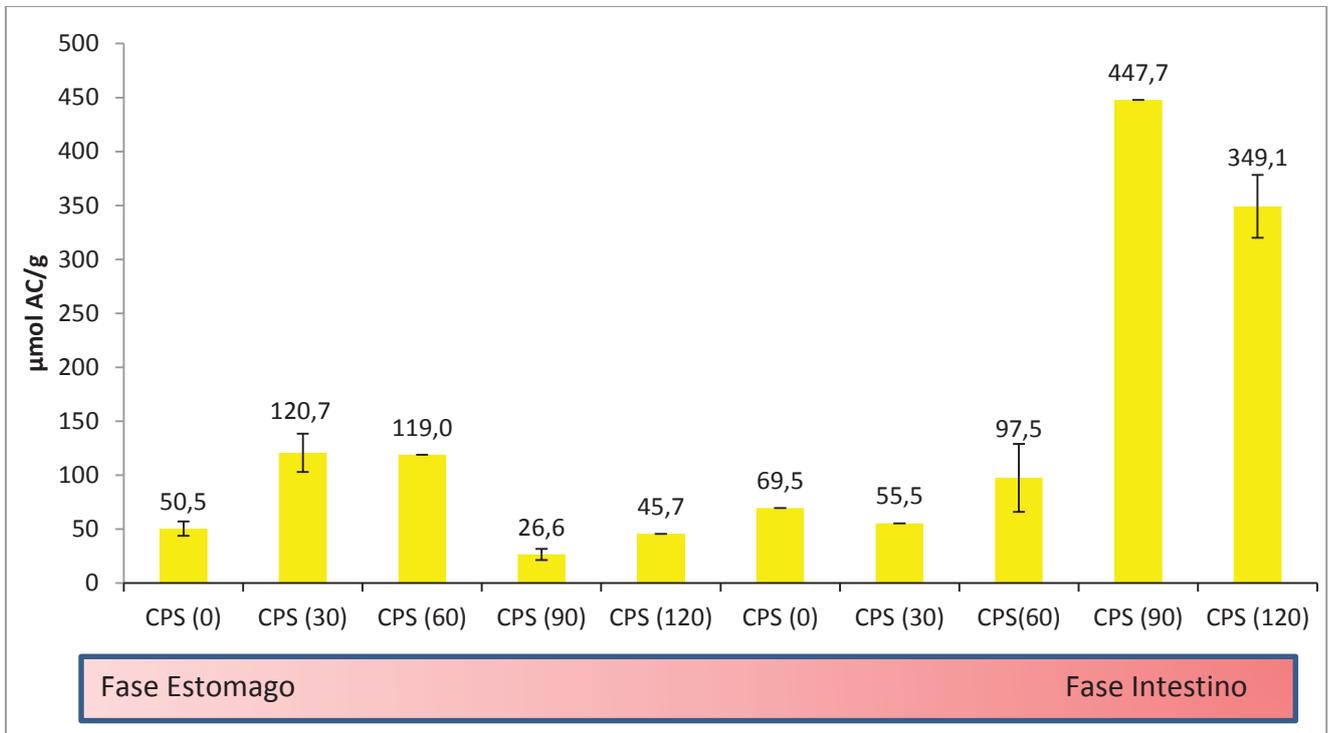
É importante ressaltar que os biopéptidos serão absorvidos na porção do intestino delgado, Joubran et al. (2015), avaliaram a capacidade antioxidante de peptídeos de α -LA utilizando um modelo *in vitro* do intestino infantil. Foi observado que as amostras duodenais infantil apresentam atividade antioxidante superiores do que as amostras de duodeno *in vitro* de adulto, já as amostras do estomago ocorreu o contrário, apresentando maior atividade antioxidante do modelo *in vitro* adulto. A atividade antioxidante não está relacionada apenas a localização da fase de digestão, mas também para o período de vida. Nota-se que é importante avaliar as duas etapas, intestino e estomago, pois, algumas peptídeos são absorvidos também no estomago (DUPONT et al., 2010).

Os modelos simulados *in vitro* se aproxima muito do modelo *in vivo*, Sanchón et al., (2018), avaliou o perfil de peptídeos do leite liberados por digestão em modelos *in vivo* e *in vitro*, os resultados foram próximos se comparado as sequencias de aminoácidos, fosforilação e regiões de resistência a hidrólise enzimática.

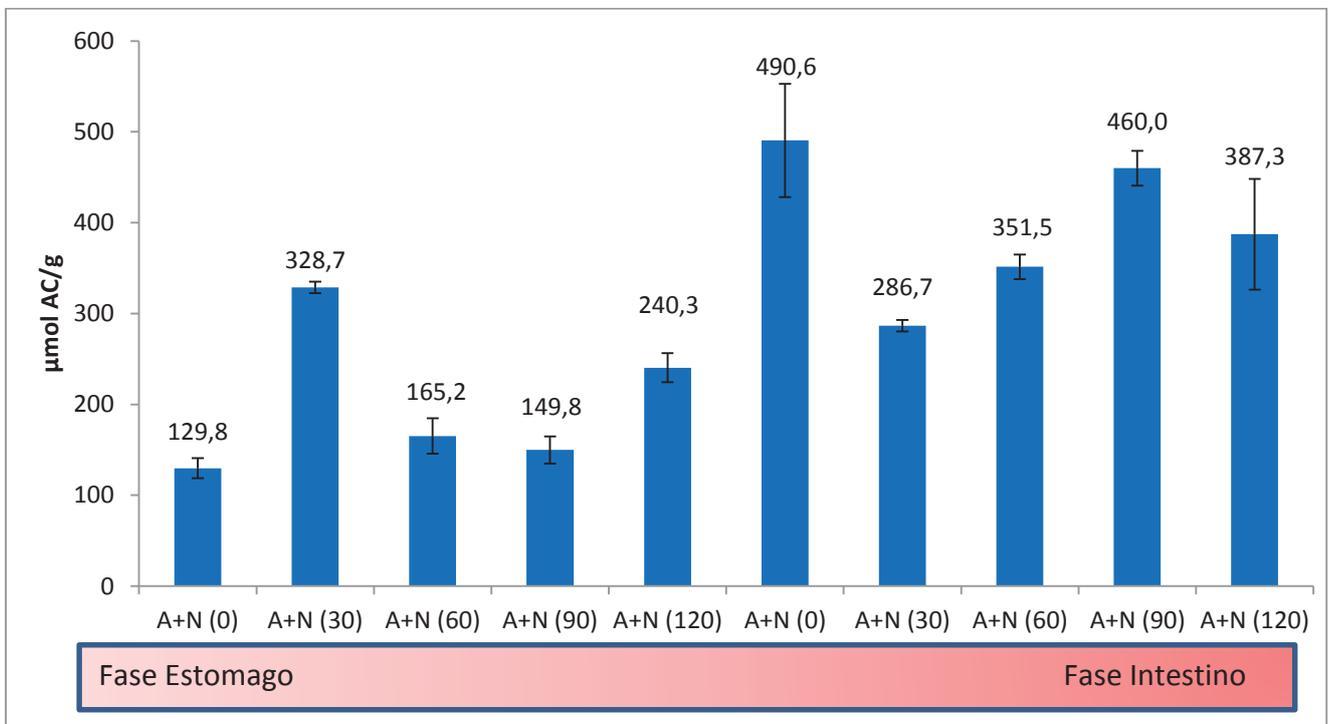
O estresse oxidativo não controlado esta relacionado ao processo inflamatório, uma das espécies reativas produzidas em excesso durante as reações inflamatórias é o ácido hipocloroso (FERNANDES et al., 2013). O processo oxidativo é uma peça chave para o controle da inflamação, peptídeos com multifuncionalidades são gerados quando se tem um alto grau de hidrólise proteica. A Figura 18 mostra a atividade anti-inflamatória dos peptídeos do soro de leite pós-digestão e hidrolisado pós-digestão, os resultados foram expressos em μ M de ácido ascórbico (AC) equivalente/ mg de proteína por meio de inibição do ácido hipocloroso.

Figura 18 - Atividade Anti-HOCl de peptídeos do CPS no decorrer da digestão A) peptídeos do CPS B) permeado de hidrólise com A+N

A)



B)



* 1. Resultados de média ± desvio padrão; Legenda: A + N: Alcalase + Neutrase permeado; WPC. Soro de leite concentrado.

Fonte: elaborado pelo Autor, 2020.

Avaliado pelo método inibição de HOCl, a proteína íntegra do CPS apresentou ($50,5 \pm 6,74 \mu\text{mol de AC/g de proteína mL}^{-1}$) no tempo 0, ao final da etapa do estômago apresentou uma leve redução ($45,7 \pm 0,18 \mu\text{mol de AC/g de proteína mL}^{-1}$) e apresentou aumento cerca 7x no final da etapa íntestino ($349,1 \pm 29,21 \mu\text{mol de AC/g de proteína mL}^{-1}$). As amostras de permeado hidrolisados por Alcalase+Neutrase apresentaram valores ($129,8 \pm 11,15 \mu\text{mol de AC/g de proteína mL}^{-1}$) no tempo 0 e ao final de fase estômago dobrou a atividade ($240,32 \pm 15,94 \mu\text{mol de AC/g de proteína}$) e contiuiu aumentar a atividade após final da etapa íntestino ($387,3 \pm 61,47 \mu\text{mol de AC/g de proteína}$). Ao longo do processo de digestão ocorre variação na atividade biológica. As amostras de disgestão do soro de leite íntacto apresentaram valores baixos durante quase todo o processo de digestão, apresentando aumento expressivo no tempo 90 da fase íntestino, a atividade anti-inflamatória parece estar relacionada com a resistência á hidrólise da β -lactoglobulina, a ação da enzima gástrica pepsina. Com a adição da pancreatina, rapidamente aumenta a digestão da β -lactoglobulina, (SOUZA et al., 2019). Conclui-se que a atividade anti-Hipoclorito apresenta forte relação com a liberação dos peptídeos pelas enzimas pancreáticas. Analisando o tempo de permanência no íntestino, até o final da fase estômago, a diferença entre o CPS e hidrolisado é grande, os hidrolizados apresentam poder inibidor de ate 8x maior que o CPS. Mas, após o final da fase íntestino essa diferença diminui, mostrando que para a atividade anti-inflamatória não tem diferenças significativas em hidrolisar previamente a proteína do soro. A atividade anti-inflamatória de peptídeos e proteínas por inibição do mecanismo gerador HOCl é conhecida, Izadi e Fazilati, (2018) avaliaram a ação da ficocianina, uma ficobiliproteína de peso moléculas 19-14 kDa extraída de microalgas como a spirulina. A atividade inibitória da ficocianina foi de 12,94%.

Outra proteína com ação anti-HOCl é a melanina, Gonçalves e Pombeiro-Sponchiado, (2005), avaliaram pigmentos proteicos (melanina) de *Aspergillus nidulans*, comparando com a melalina sintética. O efeito inibitório foi bem próximo, sugerindo dependência da dose para inibir a oxidação pela ação do HOCl.

Poucos estudos exploram a atividade anti-inflamatória de peptídeos e seus possíveis mecanismos. É conhecido que uma dieta com leite e soro de leite tem efeito anti-inflamatório, como proteção íntestinal em crianças (DALLAS et al., 2014; DALLAS et al., 2013), capacidade de diminuir a inflamação em células 3T3-F442 de Tripeptídeos derivados do leite IPP (Ile-Pro-Pro) e VPP (Val-Pro-Pro). Umas das proteínas do soro de leite, a Lactoferrina, tem efeito anti-inflamatório. A lactoferrina tem a capacidade de diminuição nos níveis séricos

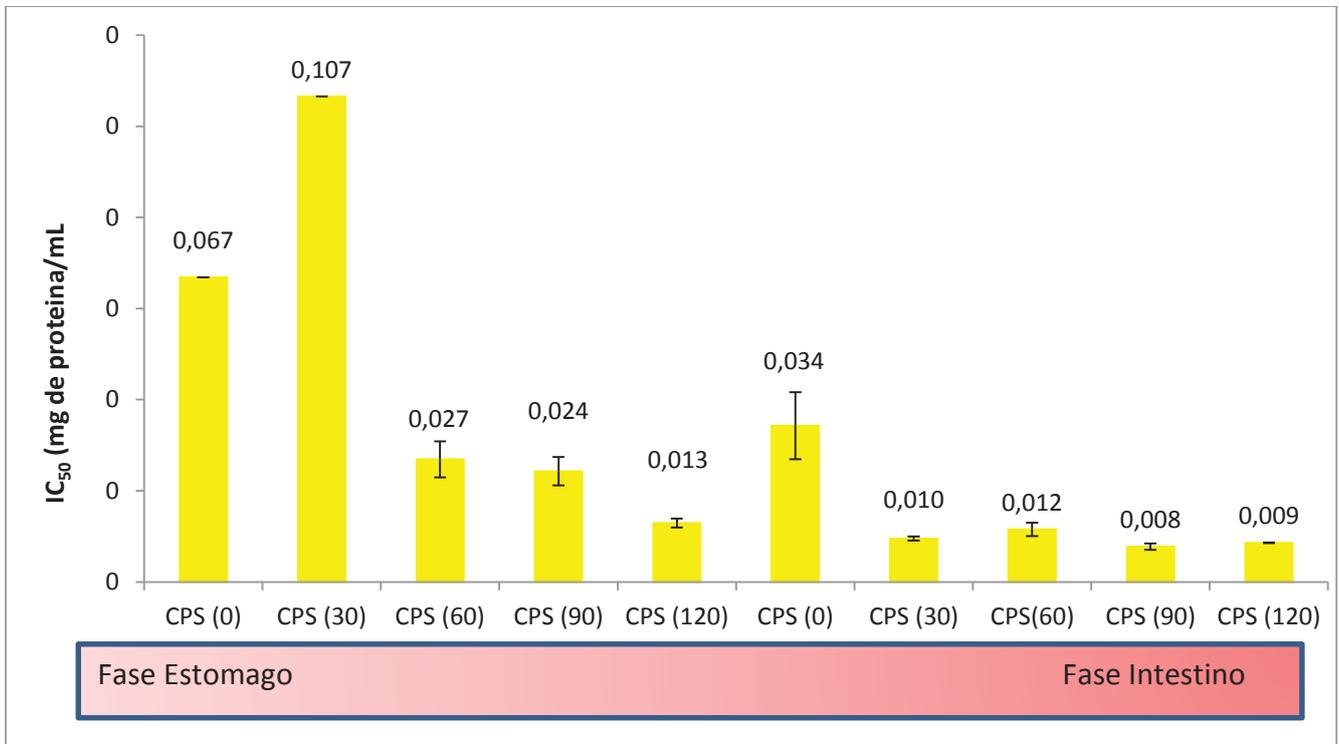
de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6, IL-18, TNF- α , lipocalina, à diminuição de NF κ B a jusante indicadores de sinalização, e estimulação de SOD e expressão de NrF2. NF κ B, conhecido como regulador transcricional cardinal de respostas inflamatórias, esse mecanismo tem ação em diminuir a inflamação, além disso, o estudo de Mohamed et al., (2018), provou que a diminuição dos processos inflamatórios auxilia no controle da doença Diabetes.

Os danos causados por espécies reativas de oxigênio em células β pancreáticas, altera a cascata de sinalização de insulina, levando a um quadro de resistência à insulínica, diminuição de tolerância a glicose e disfunção mitocondrial, principal patogênese do desenvolvimento e progressão do diabetes tipo 2 (HANCHANG et al., 2019; MOUSSA 2008) diversos estudos relaciona o estresse oxidativo com patogênese da Diabetes mellitus (SUOMALAINEN; BATTERSBY, 2018; BURGOS-MORON et al., 2019; ROMA JONAS, 2020; ANIGBORO, 2019) e ainda na condição de hiperglicemia crônica, se não for tratada, ocorre aumento de espécies reativas de oxigênio mitocondrial e não mitocondrial (MOUSSA, 2008).

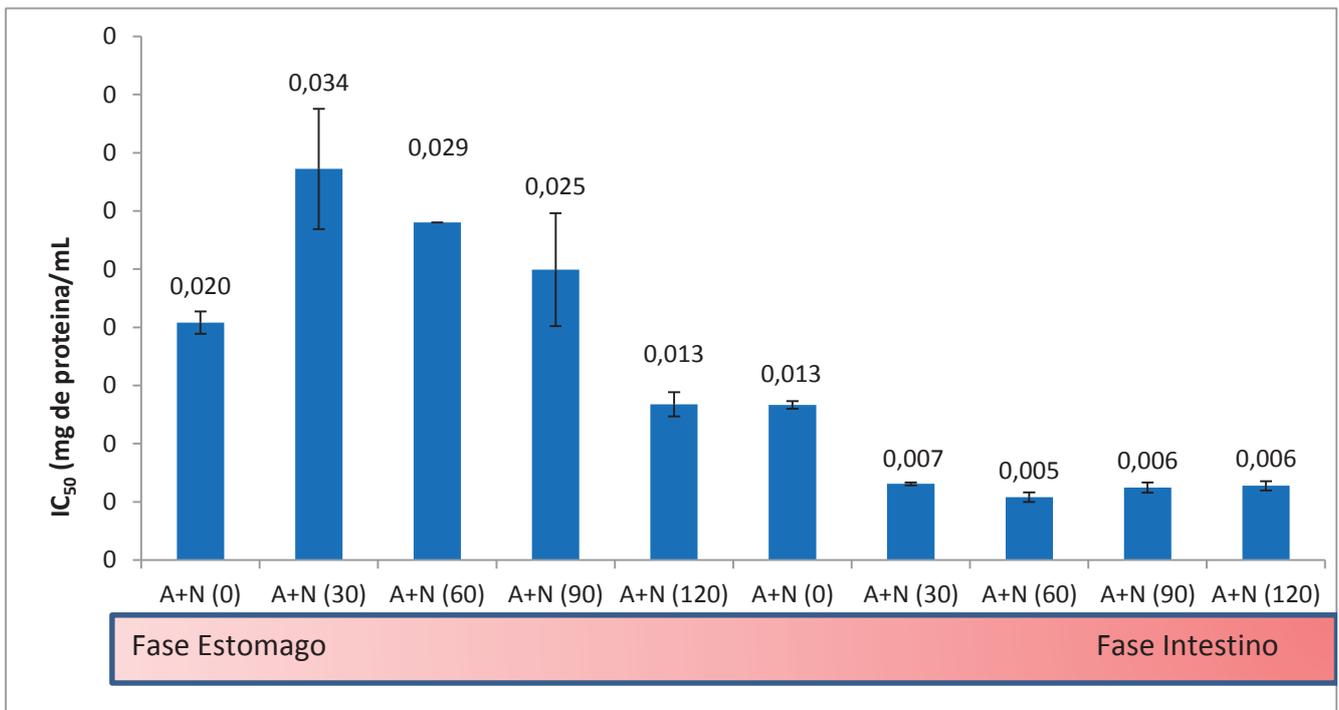
A metabolização do carboidrato (açúcares complexos e polissacarídeos) por enzima hidrolases como α -amilase, α -glucosidase, maltase etc, auxilia na liberação de açúcares simples como a glicose, aumentando a absorção rápida de açúcar sérico (ANIGBORO et al., 2018). Portanto os inibidores de α -amilase são uma das opções estudadas atualmente para retardar a absorção de glicose no sangue, principalmente em pacientes diabéticos mellitus tipo 2, após ingestão de alimentos ricos em carboidratos (AVWIOROKO et al., 2020), aliar peptídeos com efeito multifuncional, auxilia na manutenção da saúde por diferentes mecanismos. A Figura 19 mostra a atividade inibidora da α -amilase dos peptídeos do soro de leite pós-digestão e hidrolisados pos-digestão expressos em inibição de 50 por cento da atividade da enzima/g de proteína mL⁻¹.

Figura 19 - Atividade Anti α -amilase de peptídeos do CPS no decorrer da digestão A) peptídeos do CPS B) permeado de hidrólise com A+N

A)



B)



* 1. Resultados de média \pm desvio padrão; Legenda: A + N: Alcalase + Neutrase; WPC. Soro de leite concentrado

Fonte: elaborado pelo Autor, 2020

A digestão apresenta influencia na funcionalidade dos peptídeos do soro de leite, as amostras de CPS intacto e soro hidrolisado por Alcase+Neutrase apresentaram melhora significativa na atividade antidiabética pós-digestão. Avaliado pelo método inibidor de α -amilase, a proteína integra do CPS apresentou melhora na bioatividade, IC_{50} ($0,013 \pm 0,0098$ g de proteína mL^{-1}) amostra avaliada no final da etapa do estomago e seguiu até o final da etapa intestino IC_{50} ($0,009 \pm 0,0007$ g de proteína mL^{-1}). O mesmo foi observado pela amostra de permeado hidrolisado por Alcalase e Neutrase melhoras no efeito inibitório ao final da fase estomago IC_{50} ($0,013 \pm 0,0004$ g de proteína mL^{-1}) e seguiu com melhora significativa após final da etapa intestino IC_{50} ($0,0063 \pm 0,0003$ g de proteína mL^{-1}). Comportamento similar foi relado por El et al, (2015), avaliaram a atividade inibidora de α -amilase dos peptídeos de Kefir e leite de cabra, amostra de leite de cabra digerido IC_{50} ($0,000027 \pm 0,000005$ kefir digerido $0,000032 \pm 0,000007$ leite de cabra $0,002429 \pm 0,000182$, Kefir $0,000139 \pm 0,000012$ g de proteína mL^{-1}).

Os resultados indicam que a digestão simulada aumenta o efeito inibitório de peptídeos contra a enzima α -amilase em hidrolisar o carboidrato. Os resultados sugerem que os peptídeos do soro de leite podem auxiliar no combate a Diabetes Mellitus tipo 2, para ingestão de alimentos ricos em carboidratos. Colaborando com outros estudos que destacam as proteínas do soro de leite com potencial antidiabético após digestão, com a proteína previamente hidrolisada e submetida à digestao (POWER GRANT et al., 2015). A lactoferrina é relatada por exercer efeito nos níveis basais de HbA1c, IMC e perfil lipídico em paciebtes pediátrica obesos e observados aumento de genes de expressão de PPAR- γ e SIRT-1 (MOHAMED et al., 2018). Ratos alimentados com hidrolisado de proteína do leite de camelo apresentaram atividade hipoglicêmica e hipolipidemiantes, além de melhoras na atividade da superóxido dismutase e catalase, preservação das células β (KILARI et al., 2021). Mostrando que o soro do leite tem potencial em auxiliar no controle de doenças metabólicas por diversos mecanismos como ação antioxidante preservando as células, melhorando a resposta da insulina, atividade mitocondrial e inibição da α -amilase, retardando a liberação do amido.

A produção de peptídeos com potencial multifuncional tornasse de grande importância na manutenção de doenças metabólicas como no caso da Diabetes tipo 2. Os inibidores de α -amilase como a acarbose possuem efeitos colaterais indesejáveis como desconforto abdominal e flatulência em pacientes diabéticos em uso do medicamento, pois possui uma alta capacidade de retardar a quebra do amido no trato gastrointestinal (ADEFEGHA et al., 2016;

ADEFEGHA e OBOH, 2012). Os resultados indicam que uma dieta com peptídeos do soro de leite pode reduzir a atividade da α -amilase, ajudando a controlar o pico de níveis de glicose no sangue em pacientes diabéticos pós consumo de carboidratos. Acredita-se que os peptídeos podem apresentar efeitos colaterais mais brandos em relação atividade extremamente alta da acarbose, proporcionando melhor adesão e qualidade de vida para o paciente diabético.

O desenvolvimento de biopeptídeos multifuncionais é de grande importância do ponto de vista saúde e agregar valor a subprodutos do soro de leite. O estilo de vida atualmente acentua condições patológicas como a diabetes e hipertensão, o que se torna um grande problema de saúde pública em países desenvolvidos e em desenvolvimento (ALUKO, 2015). Todas as células do corpo metabolizam o carboidrato para gerar “energia” na forma de ATP, os desafios na manutenção dos níveis de glicose sanguínea são altíssimos e a situação se complica pelo estresse oxidativo. Em uma condição de diabetes mellitus prolongada, as atividades deletérias das espécies reativas são elevadas; portanto, restringindo as atividades desses grupos reativos produziram alguns resultados positivos em pacientes suplementados com peptídeos ao longo do tempo (OYEDEMI et al., 2017).

A atividade biológica dos peptídeos está relacionada com os grupos químicos expostos na hidrólise, as endopeptidase como a Alcalase é conhecido por expor grupos hidrofóbicos dos aminoácidos C₂ e em C₄, responsáveis por aumentar a atividade funcional (FITZGERALD et al., 2020; SARMADIA, ISMAIL, 2010; GALLEGO et al., 2020). Essa pode ser a diferença na melhora da atividade bioativa dos hidrolisados previamente pós-digestão em relação à proteína integra pós-digestão. Outro fator que contribui é o alto grau de hidrólise, ao final da reação são formados di e tripeptídeos, tamanho molecular apontado como primordial para melhora da atividade bioativa pós-digestão, estabilidade e biodisponibilidade (FITZGERALD et al., 2020; GALLEGO et al., 2020).

Este estudo mostrou que ao manipular a conformação de proteínas com tratamento térmico de pré-hidrólise, combinado com uma seleção enzimas cuidadosamente selecionadas, aliado ao processo de ultrafiltração, podem ser produzidos peptídeos com multifuncionalidades a partir de CPS, podendo ser utilizado como ingredientes na fabricação de alimentos funcionais e nutracêuticos.

3.4 CONCLUSÃO

A hidrólise enzimática para produção de peptídeos bioativos representa uma opção viável para valorizar as proteínas do soro de leite. A combinação de enzimas Alcalase e Neutrase aumenta significativamente o grau de hidrólise, em conjunto com operação de Ultrafiltração, permite obtenção de peptídeos de baixo peso molecular e melhora nas atividades biológicas após digestão gastrointestinal. A caracterização físico-química e molecular comprovou a separação de peptídeos entre as correntes retidas e permeadas. O perfil molecular mostrou diminuição de proteínas de peso molecular na faixa de 100 a 250 kDa após a Ultrafiltração. Por outro lado, após hidrólise e ultrafiltração, e após a digestão, o produto obtido apresentou perfil de peptídeos somente com peso molecular menor 10 kDa.,

Para todas as atividades biológicas testadas, os hidrolisados proteicos e ultrafiltrados apresentam melhora na bioatividade (inibição de radical ABTS e FRAP, Anti- α -Amilase) se comparado com a proteína íntegra. A bioatividade dos peptídeos após simulação gastrointestinal apresentou variações no decorrer da digestão, foi observado melhora na bioatividade pós digestão da proteína intacta do soro e hidrolisados previamente em relação as amostras antes da digestão. As bioatividades como a ação anti-inflamatória, anti-diabética e antioxidante apresenta relação com os peptídeos liberados pela ação das enzimas pancreáticas. A β -lactoglobulina é resistente a hidrólise, sendo rapidamente hidrolisada pelas enzimas pancreáticas. A atividade anti-HOCl não apresentou diferenças significativas do soro de leite digerido em relação aos hidrolisados pós digestão.

Os resultados da combinação de enzimas, aliados a ultrafiltração, diminuíram o peso molecular e melhoram a biodisponibilidade, contribuindo com o desenvolvimento de peptídeos com maior capacidade funcional em relação a proteína íntegra pós-digestões. As propriedades estruturais de peptídeos, como o tamanho do peptídeo ou hidrofobicidade determinar não apenas sua reatividade, mas também sua estabilidade e biodisponibilidade. Combinar enzimas aliado ao processo de ultrafiltração, melhora a biodisponibilidade de peptídeos do soro de leite, além disso, ocorreu melhora nas atividades biológicas testadas. Os resultados apresentam a potencial aplicação de peptídeos multifuncional com mecanismo que apresentam cinergismo (antioxodante, anti-inflamatória e antidiabética). A ação antioxidante é patogênese de diversas doenças metabólicas, produzir peptídeos com ação antioxidante tem uma otica diferenciada.

Uma questão que deve ser considerada são as interações da matriz alimentar com os peptídeos, uma vez que os alimentos podem causar modificação química que podem levar a alteração na bioacessibilidade e/ou biodisponibilidade dos peptídeos do soro do leite.

4. CONCLUSÃO GERAL

A combinação de enzimas Alcalase e Neutrase aumenta significativamente o grau de hidrólise, em conjunto com operação de Ultrafiltração, permitindo a obtenção de peptídeos de baixo peso molecular e melhorando a atividade biológica após digestão gastrointestinal. Conforme já teorizado pela análise bibliométrica, as propriedades estruturais de peptídeos e alto grau de hidrólise determinam o resultado de um peptídeo com ação bioativa. Com o avanço do grau de hidrólise os peptídeos apresentam melhora no efeito antioxidante, reduzindo o estresse oxidativo celular.

Os peptídeos se ingeridos via oral passam por digestão, as ações do sistema digestório alteram a estrutura proteica. Com isso, a bioatividade pode ser melhorada ou em alguns casos diminuir o efeito biológico, especialmente ocorre mudança rápida quando adicionado as enzimas pancreáticas. As bioatividades como a ação anti-inflamatória, anti-diabética e antioxidante está realacionada com os peptídeos liberados pela ação das enzimas pancreáticas. Os resultados da combinação de enzimas, aliados a ultrafiltração, diminuíram o peso molecular e melhoram a biodisponibilidade, contribuindo com o desenvolvimento de peptídeos com maior capacidade funcional em relação a proteína íntegra pós-digestão.

REFERÊNCIAS

- ADEFEGHA, S. A; OBOH, G. In vitro inhibition activity of polyphenol-rich extracts from *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry (Clove) buds against carbohydrate hydrolyzing enzymes linked to type 2 diabetes and Fe²⁺ -induced lipid peroxidation in rat pancreas. **Asian Pac. J. Trop. Biomed.** 2012 P. 774-781. DOI: 10.1016/S2221-1691(12)60228-7
- ADEFEGHA, S. A; OBOH, G; OMOJOKUN, O.S ; JIMOH, T. O; OYELEYE, S. I. In vitro antioxidant activities of African birch (*Anogeissus leiocarpus*) leaf and its effect on the α amylase and α -glucosidase inhibitory properties of acarbose. **J. Taibah Univ. Med. Sci.** V. 11(3), p.236-242., 2016. DOI: 10.1016/j.jtumed.2016.03.001
- ADJONU , R; DORAN , G; TORLEY , P; AGBOOLA, S. Screening of whey protein isolate hydrolysates for their dual functionality: Influence of heat pre-treatment and enzyme specificity. **Food Chem.** , V. 136, pp. 1435 - 1443, 2013. DOI: 10.1016 / j.foodchem.2012.09.053
- ADLER-NISSEN, J. Enzymic hydrolysis of food proteins. **London: Elsevier Applied Science Publishers Ltd.**.v. 9–56, p. 110–169, 1986.
- ADMASSU, H; GASMALLA, M. A. A; YANG, R; ZHAO, W. Identification of novel bioactive peptides with #-amylase inhibitory potential from enzymatic protein hydrolysates of

red seaweed (*Porphyra* spp). **J. Agric. Food Chem.** v. 66, 19,p. 4872–4882, 2018. DOI: 10.1021/acs.jafc.8b00960

ANIGBORO, A. A; AVWIOROKO, O. J; OHWOKEVWO O. A; NZOR, J.N. Phytochemical constituents, antidaibetic and ameliorative effects of polyalthia longifola leaf extracts in alloxan-induced diabetic rats. **J. Appl. Sci. Environ. Manag.** v. 22(6), p. 993, 2018 DOI: 10.4314/jasem.v22i6.25

ARIA, M; CUCCURULLO, C. Bibliometrix: an R-tool for comprehensive science mapping analysis. **J Inform.**v. 11, p. 959–975, 2017. DOI: 10.1016/j.joi.2017.08.007

ARROUME, N; FROIDEVAUX, R; KAPEL, R; CUDENNEC, B; RAVALLEC, R; FLAHAUT, C; BAZINET, L; JACQUES, P; DHULSTER, P. Food peptides: purification, identification and role in the metabolismo. **Curr. Opin. Food Sci.**, v. 7, p. 101-107, 2016, DOI:10.1016/j.cofs.2016.02.005

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). **Official methods of analysis of AOAC international.** 16 ed., Arlington: AOAC International, 1995.

ARNOUS, A; MAKRIS, D; KEFALAS, P. Correlation of pigment and flavonol contente with antioxidant properties in selected aged regional wines from greece. **Journal od food composition and analysis.** V.15, P. 655-665, 2002.

AVWIOROKO, O.J; ANIGBORO, A.A; ATANU, F.O; OTUECHERE, C.A; ALFRED, M.O; ABUGO, J.N; OMOROGIE, M.O. Investigation of the binding interaction of α -amylase with *Chrysophyllum albidum* seed extract and its silver nanoparticles: a multi-spectroscopic approach. **Chem. Data Collections**, 100517, 2020. DOI: 10.1016/j.cdc.2020.100517

AYYASH, M; AL-NUAIMI, A. K; AL-MAHADIN, S; LIU, S-Q. In vitro investigation of anticancer and ACE-inhibiting activity, α -amylase and α -glucosidase inhibition, and antioxidant activity of camel milk fermented with camel milk probiotic: A comparative study with fermented bovine milk. **Food Chemistry.** v. 239, p.588-597, 2018,. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.06.149

BACENETTI, J; BAVA, L; SCHIEVANO, A; ZUCALI. M. Whey protein concentrate (WPC) production: environmental impact assessment. **Journal of Food Engineering**, v. 224, pp. 139-147, 2018.

BALLATORE, M. B; , BETTIOL, M. D. R; BRABER, N. L. V; AMINAHUEL,C. A. C; ROSSI, Y. E; PETROSELLI, G; ERRA-BALSELLS, R; CAVAGLIERI, L. R; , MONTENEGRO, M. A. Antioxidant and cytoprotective effect of peptides produced by hydrolysis of whey protein concentrate with trypsin. *Food Chemistry* , v. 319, 126472, 2020. DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.126472

BALDASSO, C. BARROS, T. TESSARO, I. Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. *Desalination*, v.278, p. 381-386, 2011. doi: 10.1016/j.desal.2011.05.055

BAMDAD, F; BARK, S; KWON, C. H; SUH, J. W; SUNWOO, H. **Anti-inflammatory and antioxidant properties of peptides released from beta-lactoglobulin by high hydrostatic pressure-assisted enzymatic hydrolysis.** *Molecules*, v.22, 2017. DOI: 10.3390/molecules22060949

- BAMM, V. V; HARAUZ, G. Hemoglobin as a source of iron overload in multiple sclerosis: does multiple sclerosis share risk factors with vascular disorders?, **Cell Mol. Life Sci.** v.71 (10), 2014
- BARRY, K. M.; DINAN, T. G; KELLY, P. M. Pilot scale production of a phospholipid-enriched dairy ingredient by means of an optimised integrated process employing enzymatic hydrolysis, ultrafiltration and super-critical fluid extraction. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 41, p. 301-306, 2017. DOI: 10.1016/j.ifset.2017.04.004
- BENZIE, I. F. F; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, p. 70–76, 1996. DOI: 10.1006 / abio.1996.0292
- BONCLER, M; KEHREL, B; SZEWCZYK, R; STEC-MARTYNA, E; BEDNAREK, R; BRODDE, M; WATALA, C. Oxidation of C-reactive protein by hypochlorous acid leads to the formation of potent platelet activator International Journal of Biological Macromolecules, v. 107, p. 2701-2714, 2018. DOI: 10.1016 / j.ijbiomac.2017.10.159
- BU, T., ZHOU, M., ZHENG, J., YANG, P., SONG, H., LI, S., WU, J. Preparation and characterization of a low-phenylalanine whey hydrolysate using two-step enzymatic hydrolysis and macroporous resin adsorption. **LWT - Food Science and Technology**, 109753, 2020. doi: 10.1016 / j.lwt.2020.109753
- BURGOS-MORON, E; ABAD-JIMENEZ, Z; MARANON, A.M; IANNANTUONI, F; ESCRIBANO-LOPEZ, I; LOPEZ-DOMENECH, S; SALOM, C; JOVER, A; MORA, V; ROLDAN, I; SOLA, E; ROCHA, M; VICTOR, V.M. Relationship Between Oxidative Stress, ER Stress, and Inflammation in Type 2 Diabetes: The Battle Continues, **J Clin Med** 8(9), 1385, 2019. DOI: 10.3390/jcm8091385:
- CELLI, J. P; SPRING, B. Q; RIZVI, I; EVANS, C. L; SAMKOE, K. S; VERMA, S; POGUE, B. W; HASAN, T. Imaging and photodynamic therapy: mechanisms, monitoring, and optimization. *Chem. Rev.*, v. 110 , p. 2795-2838, 2010.
- CHAVEZ-SERVIN, J. L; CARBOT, K. D; GARCIA-GASCA, T; CASTELLOTE, A. I; LOPEZ-SABATER, M. C. Content and evolution of potential furfural compounds in commercial milk-based infant formula powder after opening the packet. **Food Chemistry**, v. 166, p. 486–491, 2015. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.06.050.
- CHEISON,S.C;. KULOZIK, U. Impact of the environmental conditions and substrate pre-treatment on whey protein hydrolysis: A review. *Critical Reviews in. Food Science and Nutrition*, v. 57, p. 418-453, 2017, DOI: 10.1080 / 10408398.2014.959115
- CHEISON, S. C.; WANG, Z.; XU, S. Y. Use of response surface methodology to optimise the hydrolysis of whey protein isolate in a tangential flow filter membrane reactor. **Journal of Food Engineering**, v. 80, p. 1134-114, 2007. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2006.09.014
- CHEUNG, I. W. Y.; CHEUNG, L. K.Y.; TAN, N. Y.; LI-CHAN, E. C.Y. The role of molecular size in antioxidant activity of peptide fractions from Pacific hake (*Merluccius productus*) hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 134, p. 1297-1306, 2012. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.02.215

CHERYAN, M. Ultrafiltration and Microfiltration Handbook. **Technomic Publishing Co., Lancaster, PA**, 2^a ed., 1998, p. 526

CICCAGLIONE, A.F.; GIULIO, M.D.; LODOVICO, S.D.; CAMPLI, E.D.; CELLINI, L.; MARZIO, L. Bovine lactoferrin enhances the efficacy of levofloxacin-based triple therapy as first-line treatment of *Helicobacter pylori* infection: an *in vitro* and *in vivo* study. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 74, p. 1069–1077, 2019. DOI: 10.1093/jac/dky510

COBO, M. J; LO'PEZ-HERRERA, A. G; HERRERA-VIEDMA, E; HERRERA, F. Science mapping software tools: review, analysis, and cooperative study among tools. **J Am Soc Inf Sci Technol**, v. 62, p. 1382–1402, 2011. DOI: 10.1002/asi.21525

CONTRERAS, M.M.; EXPOSITO, L.I.; LEDESMA B.H.; M. RAMOS, M.; RECIO, I.. Application of mass spectrometry in the characterization and quantification of bioactive peptides derived from food. **J AOAC Int**, v.91, p. 981 - 994, 2008

CONWAY, V; GAUTHIER, S.F; POULIOT, Y. Antioxidant activities of buttermilk proteins, whey proteins, and their enzymatic hydrolysates. **J. Agric. Food Chem**, v. 61, p. 364-372, 2013. DOI: 10.1021/jf304309g

CORROCHANOa. R; ARRANZ, E; DE NONI, I; STUKNYTÈ, M; FERRARETTO, A; KELLY, P. M; BUCKIN, V; GIBLIN, L. Intestinal health benefits of bovine whey proteins after simulated gastrointestinal digestion. **Journal of Functional Foods** v. 49 p. 526–535, 2018. DOI: 10.1016/j.jff.2018.08.043

CORROCHANOb, A.R; BUCKIN, V; KELLY, P. M; GIBLIN, L. Invited review: Whey proteins as antioxidants and promoters of cellular antioxidant pathways. **Journal of Dairy Sciences**, v. 101 (6), p. 4747-4761, 2018.

CORROCHANOa. R; SARIÇAY, Y; ARRANZ, E; KELLY, P. M; BUCKIN, V; GIBLIN, L. Comparison of antioxidant activities of bovine whey proteins before and after simulated gastrointestinal digestion. **Journal of Dairy Science**. Volume 102, Issue 1, January 2019, Pages 54-67. Doi: 10.3168/jds.2018-14581

DALLAS, D.C. GUERRERO, A. KHALDI, N. BORGHESE, R. BHANDARI, A. UNDERWOOD, M.A. LEBRILLA, C.B. GERMAN, J.B. BARILE, D. THE Peptidomic Analysis of Human Milk Digestion in the Infant Stomach Reveals Protein-Specific Degradation Patterns, **The Journal of Nutrition**, v. 144, p. 815–820, 2014. DOI:10.3945/jn.113.185793

DALLAS, D.C.; GUERRERO, A.; KHALDI, N.; CASTILLO, P.A.; MARTIN, W.F.; SMILOWITZ, J.T.; BEVINS, C.L.; BARILE, D.; GERMAN, J.B.; LEBRILLA, C.B. Extensive *in vivo* human milk peptidomics reveals specific proteolysis yielding protective antimicrobial peptides. **Journal of Proteome Research**. v. 12 (5), p. 2295-2304, 2013. DOI: 10.1021 / pr400212z

DIERMAYR, P. AND DEHNE, L. Kontrollierte enzymatische Proteinhydrolyse im Bereich niedriger pH-Werte. **Z. Lebensm. Unters. Forsch.** v. 190:p. 516–520, 1990. DOI: 10.1007/BF01214073

DOUCET, D; OTTER, D. E; GAUTHIER, S. F; FOEGEDING, E. A. Enzyme-induced gelation of extensively hydrolyzed whey proteins by Alcalase: peptide identification and determination of enzyme specificity. **J. Agric. Food Chem.** v. 51, p. 6300 - 6308, 2003. DOI: 10.1021/jf026242v

DUPONT, D; MANDALARI, G; MOLLE, D; JARDIN, J; LÉONIL, J; FAULKES, R. M; WICKHAM, M. S. J; MILLS, E. N. C; MACKIE, A. **Comparative resistance of food proteins to adult and infant in vitro digestion models.** **Mol. Nutr. Food Res,** v.54, p. 767-780, 2010. DOI: 10.1002/mnfr.200900142

EL, S. N; KARAKAYA, S; SIMSEK, S; DUPONT, D; MENFAATLI, E.; EKER, A. T. In vitro digestibility of goat milk and kefir with a new standardised static digestion method (INFOGEST cost action) and bioactivities of the resultant peptides. **Food & function,** v. 6, p. 2322-2330, 2015.

ERYILMAZ, M. PALABIYIK, I. M. Hypochlorous acid-analytical methods and antimicrobial activity, **Trop. J. Pharm. Res.** v.12 p. 123–126, 2013.

FAO. 2021. **Livestock Processed.** Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 01/02/2021.

FERNANDES, E; COSTA, D; TOSTE, S. A; LIMA, J. L; REIS, S. In vitro scavenging activity for reactive oxygen and nitrogen species by nonsteroidal anti-inflammatory indole, pyrrole, and oxazole derivative drugs. **Free Radic. Biol. Med.** v. 37, p. 1895–1905, 2004.

FITZGERALD, R; CERMEÑO, M; KHALESİ, M; KLEEKAYAI, T; AMIGO-BENAVENT, M. Application of in silico approaches for the generation of milk protein-derived bioactive peptides. **Journal of Functional Foods,** v. 64, 103636, 2020. DOI: 10.1016/j.jff.2019.103636

FOSGERAU, K; HOFFMANN, T. Peptide therapeutics: current status and future directions. **Drug Discov. Today,** v. 20 p. 122-128, 2015. doi: 10.1016/j.drudis.2014.10.003

GALLEGO, M; MAURI, L; ARISTOY, M.C; TOLDRÁ, F; MORA, L. Antioxidant peptides profile in dry-cured ham as affected by gastrointestinal digestion. **Journal of Functional Foods.** v. 69, p. 103956, 2020. DOI: 10.1016/j.jff.2020.103956

GARCÍA-GARIBAY, M; JIMÉNEZ-GUZMÁN, J; HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, H. *Whey Proteins: Bioengineering and Health.* **Food Engineering Series,** p. 415–430, 2008. doi:10.1007/978-0-387-75430-7_31

GEBICKA, L; BANASIAK, E. Hypochlorous acid-induced heme damage of hemoglobin and its inhibition by flavonoids, **Toxicol. In Vitro,** v. 26 p. 924– 929, 2012

GIRARD, B.; FUKUMOTO, L. R. Membrane Processing of Fruit Juices and Beverages: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition,** v. 40, p. 91-157, 2000. doi: 10.1080 / 07388550008984168

GONCALVES, R. DE C. R; POMBEIRO-SPONCHIADO, S. R.. Antioxidant Activity of the Melanin Pigment Extracted from *Aspergillus nidulans*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin,** v. 28(6), p. 1129–1131, 2005.. DOI: 10.1248/bpb.28.1129

GUADIX, A.; CAMACHO, F.; GUADIX, E.M. Production of whey protein hydrolysates with reduced antigenicity in a stable membrane reactor. **Journal of Food Engineering**, v. 72, n. 4, 398-405, 2006. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2004.12.022

HABERT, A. C., BORGES, C.P., NÓBREGA, R. Processos de separação por membranas. **Série Escola Piloto de Engenharia Química**. Rio de Janeiro: E-papers Serviços Editoriais Ltda, 2006. 180p.

HANCHANG, W; KHAMCHAN, A; WONGMANEE, N; SEEDADEE, C. Hesperidin ameliorates pancreatic β -cell dysfunction and apoptosis in streptozotocin-induced diabetic rat model. **Life Sciences**, 116858, 2019. DOI:10.1016/j.lfs.2019.116858

HARE J, M; BEIGI, F; TZIOMALOS, K. Nitric oxide and cardiobiology-methods for intact hearts and isolated myocytes. **Methods in Enzymology**. v. 441, p.369-392, 2008. DOI: 10.1016/s0076-6879(08)01221-4.

IGHODARO, O. M. Molecular pathways associated with oxidative stress in diabetes mellitus *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 108, p. 656-662, 2018.

IZADI, M; FAZILATI, M. Extraction and purification of phycocyanin from spirulina platensis and evaluating its antioxidant and anti-inflammatory activity. **Asian Journal of Green Chemistry**, v. 2, p. 364-379, 2018. DOI: 10.22034/AJGC.2018.63597

JIANG, S.; LIU, S.; ZHAO, C.; WU, C. Developing Protocols of Tricine-SDS-PAGE for Separation of Polypeptides in the Mass Range 1-30 kDa with Minigel Electrophoresis System. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 11, p. 640-649, 2016

JOUBRAN, Y; MOSCOVICI, A; PORTMANN, R; LESMES, U. Implications of the Maillard reaction on bovine alpha-lactalbumin and its proteolysis during in vitro infant digestion. **Food Funct.**, v. 8, p. 2295-2308, 2017. DOI: 10.1039/c7fo00588

JOUBRAN, Y; MOSCOVICI, A; LESMES, U. Antioxidant activity of bovine alpha lactalbumin Maillard products and evaluation of their in vitro gastro-duodenal digestive proteolysis. **Food Funct.** p. 1229-40, 2015. DOI: 10.1039/c4fo01165a. .

KILARI, B. P; MUDGIL, P; AZIMULLAH,S; BANSAL, N; OJHA, S;MAQSOOD, S. Effect of camel milk protein hydrolysates against hyperglycemia, hyperlipidemia, and associated oxidative stress in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats. **Journal of Dairy Science**. v. 104, Ed2, p. 1304-1317, 2021.

KIM, S.B; SEO, I.S; KHAN, M.A; KI, K.S; NAM, M.S; KIM, H.S. Separation of iron-binding protein from whey through enzymatic hydrolysis. **Int. Dairy J.**, v. 17, pp. 625-631, 2007. DOI: 10.1016/j.idairyj.2006.09.001

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, p. 1309 -132, 2003. DOI: 10.2174/1381612033454883

KLAUNIG, J. E; KAMENDULIS, L. M. The role of oxidative stress in carcinogenesis *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, v. 44, p. 239-267, 2004.

KOPF-BOLANZ, K. A; SCHWANDER, F; GIJS, M; VERGÈRES, G; PORTMANN, R; EGGER, L. Impact of milk processing on the generation of peptides during digestion. **Int. Dairy J.** v. 35, p. 130-138, 2014. DOI: 10.1016/j.idairyj.2013.10.012

LACROIX, I.M.E.; MENG, G.; CHEUNG, I.W.Y.; LI CHAN, E.C.Y. Whey protein-derived peptides have dual dipeptidase iv activity and angiotensin converting enzyme, **Journal of Functional Foods**, v. 21p. 87 - 96, 2016. doi: 10.1016 / J.JFF.2015.11.038

LEE, S. Y; HUR, S. J. Peptídeos anti-hipertensivos de produtos animais, organismos marinhos e plantas. **Food Chem**, v. 228, p. 506 - 517, 2017. DOI: 10.1016 / j.foodchem.2017.02.039

LEKSRISOMPONG, P. P., MIRACLE, R. E., & DRAKE, M. Characterization of flavor of whey protein hydrolysates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58(10), p. 6318–6327, 2010. DOI: 10.1021/jf100009u.

LE MAUX, S; BOUHALLAB, S; GIBLIN, L; BRODKORB, A; CROGUENNEC, T. Complexes between linoleate and native or aggregated beta-lactoglobulin: Interaction parameters and in vitro cytotoxic effect. **Food Chemistry**, v. 141(3), p. 2305–2313, 2013.

LEWIS, M.J; GRANDISON, A.S. Separation Processes in the Food and Biotechnology Industries: Principles and Applications. Chapter 3: Pressure-activated membrane processes. **Woodhead Publishing Limited**, Cambridge, p. 65- 96, 1996

LIAO, Y; CHUN-HENGLOH; MIAOTIAN; RONGWANG; FANE, A. G. Progress in electrospun polymeric nanofibrous membranes for water treatment: Fabrication, modification and applications. **Progress in Polymer Science**. v. 77, p. 69-94, 2018. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2017.10.003

LI-CHAN, E.C.Y. ScienceDirect Bioactive peptides and protein hydrolysates : research trends and challenges for application as nutraceuticals and functional food ingredients. **Curr. Opin. Food Sci.**, v.1 pp. 28-37, 2015, DOI: 10.1016/j.cofs.2014.09.005

LI, Y; LI, B; HE, J; QIAN, P. Quantitative structure–activity relationship study of antioxidative peptide by using different sets of amino acids descriptors. **Journal of Molecular Structure**, v. 998 (1), p. 53-61, 2011. DOI: 10.1016/j.molstruc.2011.05.011 olhar essa referencia

LI, S.; TINGTING, B.; ZHENG, J.; LIU, L.; HE, G.; WU, J. Preparation, bioavailability, and mechanism of emerging activities of ile-pro-pro and val-pro-pro. *Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety*. **Journal of functional foods**, v. 18, p. 1097-1110, 2019. doi: 10.1111/1541-4337.12457

LOPES, M.; SIMÕES, S.; VEIGA, F.; SEIÇA, R.; RIBEIRO, A. Why most oral insulin formulations do not reach clinical trials. **Ther. Deliv.**, v. 6 p. 973-987, 2015. DOI: 10.4155/TDE.15.47

LORENZETTI, A; PENHA, F. M; CUNHA PETRUS, J. C; REZZADORI, K. Low purity enzymes and ultrasound pretreatment applied to partially hydrolyze whey protein. *Food Bioscience*, v. 38, 100784, 2020. DOI: 10.1016 / j.fbio.2020.100784

- LU, N; LI, J.; REN, X; TIAN, R; PENG, Y.-Y. Nitrite attenuated hypochlorous acid-mediated heme degradation in hemoglobin. **Chemico-Biological Interactions**, v. 238, p. 25–32, 2015. doi:10.1016/j.cbi.2015.05.021
- D. Maitra, I. Abdulhamid, M.P. Diamond, G.M. Saed, H.M. Abu-Soud, Melatonin attenuates hypochlorous acid-mediated heme destruction, free iron release, and protein aggregation in hemoglobin, **J. Pineal Res.** 53 (2012) 198–205.
- MAMONE, G.; PICARIELLO, G.; CAIRA, S.; ADDEO, F.; FERRANTI, P. Analysis of food proteins and peptides by techniques based on mass spectrometry. **J Chromatogr A**, v. 1216, p. 7130 - 7142, 2009. DOI: 10.1016 / j.chroma.2009.07.052
- MANN, B; KUMARI, A; KUMAR, R; SHARMA, R; PRAJAPATI, K; MAHBOOB,, S; ATHIRA, S. Antioxidant activity of whey protein hydrolysates in milk beverage system. **J. Food Sci. Technol.** v..52, p. 3235-3241, 2015.. DOI: 10.1007/s13197-014-1361-3
- MCGARRY, T; BINIECKA, M; VEALE, D. J; FEARON, U. Hypoxia, oxidative stress and inflammation **Free Radical Biology and Medicine**, v. 125, p. 15-24, 2018. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.042
- MINEKUS, M; ALMINGER, M; ALVITO, P; BALLANCE, S; BOHN, T; BOURLIEU, C; BRODKORB, A. A standardised static in vitro digestion method suitable for food – Na international consensus. **Food & Function**, 5, 1113–1124, 2014. DOI: 10.1039/c3fo60702j.
- MOHAMED, W. A; SCHAALAN, M. F. “Antidiabetic efficacy of lactoferrin in type 2 diabetic pediatrics; controlling impact on PPAR- γ , SIRT-1, and TLR4 downstream signaling pathway.” *Diabetology & metabolic syndrome*. v. 10 p. 89, 2018. DOI:10.1186/s13098-018-0390-x
- MOLLEA, C; MARMO, L; BOSCO, F. Valorisation of Cheese Whey, a By-Product from the Dairy Industry. **Food industry, InTECH Editors, Innocenzo Mazzalupo**, 2013. DOI: 10.5772/53159
- MOUSSA, S. A. “Oxidative stress in diabetes mellitus,” *Romanian Journal of Biophysics*, v. 18, n. 3, p. 225–236, 2008.
- NIELSEN, S. D; BEVERLY, R. L; QU, Y; DALLAS, D. C. Milk bioactive peptide database: A comprehensive database of milk protein-derived bioactive peptides and novel visualization.**Food Chemistry**, V. 232p. 673-682, 2017.
- NOVOZYMES. Application sheet: enzymatic hydrolysis of proteins using proteases. Novozymes Switzerland. Nutritional and technological aspects of the membrane material of the milk fat globule v. 18, p. 450-459, 2018.
- OYEDEMI, S. O; OYEDEMI, B.O; IJEH, I. I; OHANYEREM, P.E; COOPOOSAMY, R.M; AIYEGORO, O. A. Alpha-Amylase Inhibition and Antioxidative Capacity of Some Antidiabetic Plants Used by the Traditional Healers in Southeastern Nigeria. **The Sci. World J. Hindawi**, 2017, DOI: 10.1155/2017/3592491
- O’KEEFFE, M.B; RICHARD J. FITZGERALD, R.J. Antioxidant effects of enzymatic hydrolysates of whey protein concentrate on cultured human endothelial cells **International Dairy Journal**, v. 36 P. 128-135, 2014. DOI: 10.1016/j.idairyj.2014.01.013

O'KEEFFE, M.B.; CONESA, C.; FITZGERALD, R.J. Identification of angiotensin converting enzyme inhibitory and antioxidant peptides in a whey protein concentrate hydrolysate produced at semi-pilot scale. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 52 pp. 1751-1759, 2017. DOI: 10.1111/ijfs.13448

OZORIO, L., MATSUBARA, NK, EDUARDO DA SILVA-SANTOS, J., HENRY, G., LE GOUAR, Y., JARDIN, J.,... DUPONT, D. Gastrointestinal digestion enhances the endothelium-dependent vasodilation of a whey hydrolysate in rat aortic rings. **Food Research International**, 109188, 2020. doi: 10.1016 / j.foodres.2020.109188

PARKIN, K. L., DAMODARAN, S., FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4ª ed. Artmed, Porto Alegre, 2010, 900p.

PENG, X.; XIONG, Y.L.; KONG, B. Antioxidant activity of peptide fractions from whey protein hydrolysates as measured by electron spin resonance. **Food Chemistry**, v. 113, p. 196-201, 2009. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.07.068

PEREA, A.; UGALDE, U.; RODRIGUEZ, I.; SERRA, J.L. Preparation and characterization of whey protein hydrolysates: applications in industrial whey bioconversion processes. **Enzyme and Microbial Technology**, n. 15, p. 418-423, 1993

PEREA, A.; UGALDE, U. Continuous hydrolysis of whey proteins in a membrane recycle reactor. **Enzyme and Microbial Technology**, n. 18, p. 29-34, 1996.

PESSATO, T. B; CARVALHO, N. C; TAVANO, O. L; FERNANDES, L. G. R; ZOLLNER, R. L; NETTO, F. M. Whey protein isolate hydrolysates obtained with free and immobilized Alcalase: Characterization and detection of residual allergens. **Food Research International**, v. 83, p. 112-120, 2016. DOI: 10.1016/j.foodres.2016.02.015

PINTO, G. A. Biorefinaria de Soro de Queijo: engenharia de bioprocessos e sistemas aplicada à transformação de um resíduo poluente em produtos com valor agregado. **Tese (Doutorado em Engenharia Química), Centro de Ciências Exatas e Tecnologia**, Universidade Federal de São Carlos, 2008.

POWER GRANT, O; BRUEN, C; BRENNAN, L. GIBLIN, L; JAKEMAN, P; FITZGERALD, R. j. In vitro bioactive properties of intact and enzymatically hydrolysed whey protein: Targeting the enteroinsular axis, **Food Funct**, v. 6, p. 972-980, 2015. DOI: 10.1039/c4fo00983e

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 and Medicine**, v. 26, n. 9/10, p. 1231-1237, 1999, doi: 10.1016/s0891-5849(98)00315-3.

RIERA, F. B-Lactoglobulin tryptic digestion: A model approach for peptide release. **Biochemical Engineering Journal**, v. 70, p. 88-96, 2013. doi: 10.1016 / j.bej.2012.10.001

QIU, Y; SMITH, T. J; FOEGEDING, E. A; DRAKE, M. A. The effect of microfiltration on color, flavor, and functionality of 80% whey protein concentrate. **Journal of Dairy Science**, v. 98, p. 5862-5873, 2015. DOI: 10.3168/jds.2014-9174

ROMA, L. P; JONAS, J. C. Nutrient Metabolism, Subcellular Redox State, and Oxidative Stress in Pancreatic Islets and beta-Cells. **J Mol Biol**, v.432, p. 1461-1493, 2020.

SANCHÓN, J; FERNÁNDEZ-TOMÉ, S.; MIRALLES, B; HERNÁNDEZ-LEDESMA, B; .TOMÉ, D; GAUDICHON, C; RECIO, I. Protein degradation and peptide release from milk proteins in human jejunum. Comparison with *in vitro* gastrointestinal simulation. **Food Chemistry**. v. 239, p. 486-494, 2018. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.06.134

SARMADIA, B. H.; ISMAIL, A. Antioxidative peptides from food proteins: a review. **Peptides**, v. 31, p. 1949-1956, 2010. Doi: 10.1016 / j.peptides.2010.06.020

SEABRA, D;CALDEIRA-PIRES, A. The thermodynamic rarity concept: a systematic review. **Ecol Indic**, v. 108, 105689, 2020. DOI: 10.1016/j.ecolind.2019.105689

SEGURA-CAMPOS, M.; CHEL-GUERRERO, L.; BETANCUR-ANCONA, D; HERNANDEZ-ESCALANTE, V.M. Bioavailability of bioactive peptides. **Food Review International**, v. 27, P. 213 - 226, 2011. DOI: 10.1080/87559129.2011.563395

SIGURLAUG SVEINBJORNSDOTTIR. The clinical symptoms of parkison's diase. **J. Neurochem**. v. 139, 318–324, 2016.

SCICCHITANO, B. M; PELOSI, L; SICA, G; MUSARÒ, A. The physiopathologic role of oxidative stress in skeletal muscle Mechanisms of Ageing and Development, v. 170, p. 37-44, 2018

SIM, L; JAYAKANTHAN, K; MOHAN S. NASI, R; JOHNSTON, B. D; PINTO, B, M; ROSE, D. R. New glucosidase inhibitors from an ayurvedic herbal treatment for type 2 diabetes: structures and inhibition of human intestinal maltaseglucoamylase with compounds from *Salacia reticulata*. **Biochemistry**, v. 49, no. 3, p. 443–451, 2010.

SMITHERS, G. W. Whey and whey proteins-From “gutter-to-gold”. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 695-704, 2008.

SMITH, T. J.; CAMPBELL, R. E; JO, Y; DRAKE, M. A. Flavor and stability of milk proteins. **Journal of Dairy Science**, v. 99(6), p. 4325–4346, 2016. DOI: 10.3168/jds.2016-10847.

SOUZA, R.S.C; TONON, R.V; STEPHAN, M.P; SILVA, C.M; PENTEADO, A.L; CABRAL, L.M.C; KUROSZAWA, L.E. Evaluation of the antioxidant potential of whey protein concentrated by ultrafiltration and hydrolyzed by different commercial proteases. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 22, e2018021, 2019. DOI: 10.1590/1981-6723.02118

SOUSA, R; PORTMANN, R; DUBOIS, S; RECIO, IEGGER, L; Protein digestion of different protein sources using the INFOGEST static digestion model. **Food Research International**. v. 130, 108996, 2020. DOI: 10.1016/j.foodres.2020.108996

SUOMALAINEN, B.J. BATTERSBY, Mitochondrial diseases: the contribution of organelle stress responses to pathology. **Nat Rev Mol Cell Biol** v. 19(2) p. 77-92, 2018.

TOLDRÁ, F. REIG, M. ARISTOY, M. C. MORA, L. Generation of bioactive peptides during food processing. **Food Chemistry**, v. 267, p. 395-404, 2018

- UDENIGWE, C.C. Bioinformatics approaches, prospects and challenges of food bioactive peptide research. **Trends Food Sci. Technol.** v. 36 p. 137-143, 2014. doi: 10.1016/j.tifs.2014.02.004
- WANG, X. S; KIM, H. B;SZUCHMAN-SAPIR, A; MCMAHON, A; DENNIS, J. M; WITTING, P. K. Neutrophils recruited to the myocardium after acute experimental myocardial infarct generate hypochlorous acid that oxidizes cardiac myoglobin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 612, p. 103-114, 2016. DOI: 10.1016/j.abb.2016.10.013
- WEISS, S.J., KLEIN, R., SLIVKA, A., WEI, M., 1982. Chlorination of taurine by the human neutrophils. **J. Clin. Invest.** 10, 598–607. DOI: 10.1172 / JCI110652
- WHETSTINE, M. E. C., DRAKE, M. A. The flavor and flavor stability of skim and whole milk powders. **Flavor of dairy products.** p. 217–251, 2007. DOI: 10. 1021/bk-2007-0971.ch013.
- WIDMAIER, E.; STRANG, K.; RAFF, H. Vander's Human Physiology: The Mechanisms of Body Function. McGraw- Hill. **Science Engineering** 13th ed. P. 562, 2013.
- WOODLEY, J.F. Enzymatic barriers for gastrointestinal peptide and protein delivery. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 11 p. 61-95, 1994.
- XU, W.. KONG, B. H;. ZHAO. X. H.Optimization of some conditions of neutrase-catalyzed plastein reaction to mediate ACE-inhibitory activity in vitro of casein hydrolysate prepared by neutrase. **J. Food Sci. Technol**,v. 51 p. 276-284, 2014. DOI: 10.1007/s13197-011-0503-
- YADAV, J.S.S.; YAN, S.; PILLI, S.; KUMAR, L.; TYAGI, R. D.; SURAMPALLI, R. Y. Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 756-774, 2015
- YADAV, J.S.S.; YAN, S.; AJILA, C.M.; BEZAWADA, J.; TYAGI, R.D.; SURAMPALLI, R.Y. Food-grade single-cell protein production, characterization and ultrafiltration recovery of residual fermented whey proteins from whey. **Food and Bioproducts Processing**, v. 99, p. 156-165, 2016. doi: 10.1016/j.fbp.2016.04.012
- YU, Z; YIN, Y; ZHAO, W; LIU, J; CHEN, F. Anti-diabetic activity peptides from albumin against a-glucosidase and a-amylase. **Food Chemistry**, v. 135, p.. 2078-2085, 2012. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.06.088
- YU, Z; YIN, Y; ZHAO, YU, Y; LIU, LIU, J; CHEN, F. Novel peptides derived from egg white protein inhibiting alpha-glucosidase. **Food Chemistry** v. 129, p. 1376-1382, 2011
- ZOTTA, T. SOLIERI , L. IACUMIN , L, PICOZZI, C; GULLO, M. Valorization of cheese whey using microbial fermentations. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** , 104 (2020) , pp. 2749 - 2764. DOI: 10.1007/s00253-020-10408-2

APÊNDICE A - PROCEDIMENTO DE LIMPEZA DA MEMBRANA

A limpeza foi conduzida conforme os passos apresentados abaixo. Após o reestabelecimento do pH depois de cada etapa de limpeza o fluxo de permeado com água foi medido para verificar a eficiência da limpeza, devendo atingir no mínimo 95 % do valor inicial.

1. Enxágue com água destilada, descartando-se permeado e rejeito, para eliminação dos sólidos do sistema;
2. Enxágue com água destilada com recirculação por 30 minutos;
3. Limpeza alcalina: pH ajustado entre 10,0 e 10,5 com solução de hidróxido de sódio 1,0 N, com recirculação de permeado e rejeito aquecido entre 40 e 50 °C por 30 minutos;
4. Limpeza cloro-alcalina: pH ajustado entre 10,0 e 10,5 com solução de hidróxido de sódio 1,0 N, adição de 200 ppm de hipoclorito de sódio, com recirculação de permeado e rejeito aquecido entre 40 e 50 °C por 30 minutos. A limpeza alcalina e cloro alcalina procedeu-se com adição de detergente não-iônico (Ultrakleen II) na concentração de 0,1% do volume da solução, nos casos necessários.
5. Enxágue conforme o primeiro passo, até atingir pH neutro;
6. Limpeza ácida: pH ajustado entre 1,8 e 2,0 com solução de ácido nítrico, com recirculação de permeado e rejeito aquecido entre 40 e 50 °C por 30 minutos;
7. Enxágue conforme o primeiro passo, até atingir pH neutro;
8. Limpeza alcalina com adição de enzima em concentração de 0,5% do volume da solução, com recirculação de permeado e rejeito por 30 minutos a 42 °C;
9. Enxágue conforme o primeiro passo, até atingir pH neutro;

**APÊNDICE B - CÁLCULO DA CADEIA MÉDIA DOS PEPTÍDEOS COM
HIDRÓLISE DE ALCALASE E NEUTRASE INDIVIDUAL**

1) Alcalase

Tempo	n° mols	Média GH	CMC	MMM
0,17	0,032	4,85	20,61	2474,22
0,33	0,055	8,25	12,12	1454,54
0,50	0,076	11,24	8,89	1067,61
0,67	0,097	14,51	6,89	827,01
0,83	0,109	16,18	6,18	741,65
1,00	0,120	17,87	5,59	671,51
1,17	0,130	19,37	5,16	619,51
1,33	0,138	20,49	4,88	585,65
1,50	0,141	20,93	4,77	573,33
1,67	0,142	21,06	4,74	569,80
1,83	0,142	21,06	4,748	569,80
2,00	0,142	21,06	4,74	569,80

2) Neutrase

Tempo	n° mols	GH	CMC	MMM
0,2	0,001	0,81	123,45	14814,81
0,3	0,003	1,44	69,44	8333,33
0,5	0,006	1,93	51,81	6217,61
0,8	0,010	2,43	41,15	4938,27
1,3	0,015	2,75	36,36	4363,63
1,8	0,020	3,01	33,22	3986,71
2,3	0,025	3,18	31,44	3773,58
2,8	0,030	3,5	28,57	3428,57