



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
DE ALIMENTOS**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANO DE  
PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE CONCENTRADAS POR MEMBRANAS E  
HIDROLISADAS POR DIFERENTES ENZIMAS COMERCIAIS**

**RENATA SILVA CABRAL DE SOUZA**

*Sob Orientação da Professora*  
**Louise Emy Kurozawa**

*e Co-orientação da Pesquisadora*  
**Lourdes Maria Corrêa Cabral**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências, Área de Concentração em Tecnologia de Alimentos.

**Seropédica, RJ  
Maio de 2013**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS**

**RENATA SILVA CABRAL DE SOUZA**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências** no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, área de Concentração em Tecnologia de Alimentos.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 23/05/13

---

Lourdes Maria Corrêa Cabral Dr<sup>a</sup>. Embrapa Agroindústria de Alimentos  
(Co-orientadora)

---

Cristina Yoshie Takeiti. Dr<sup>a</sup>. Embrapa Agroindústria de Alimentos

---

Mônica Marques Pagani. Dr<sup>a</sup>. UFRRJ

*Dedico este trabalho aos meus pais,  
Oswaldo e Irene pelo exemplo de  
simplicidade, dedicação, perseverança,  
honestidade e amor incondicional;*

*Aos familiares queridos, de longe e de  
perto;*

*Aos amigos;*

*Com todo meu carinho,  
admiração, respeito e  
gratidão.*

*“O êxito na vida não se mede por aquilo conquistado, mas pelas dificuldades que foram superadas pelo caminho.”*

*(Abraham Lincoln)*

*Quando estiver em dificuldade e pensar em desistir, olhe para trás e lembre-se dos obstáculos que já superou.*

*Se tropeçar e cair, levante-se, não fique prostrado, olhe para frente e esqueça o passado.*

*Ao sentir-se orgulhoso por alguma realização pessoal, olhe para dentro e sonda suas motivações.*

*Antes que o egoísmo o domine, enquanto seu coração é sensível, olhe para os lados e socorra aos que te cercam.*

*Na escalada rumo às altas posições, no afã de concretizar seus sonhos, olhe para baixo e observe se não está pisando em alguém.*

*Em todos os momentos da vida, seja qual for sua atividade, olhe para cima e busque aprovação de Deus.*

*(autor desconhecido)*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus pelo presente da vida, por seu imenso amor se manifestar de diversas formas em minha existência, em todos os momentos e através de inúmeras pessoas especiais que fazem parte do meu caminho.

À prof<sup>a</sup> Louise Emy Kurozawa pela orientação e à pesquisadora Lourdes Maria Corrêa Cabral pela co-orientação. Obrigada pelo apoio, comprometimento, generosidade, profissionalismo, conhecimentos compartilhados, além da paciência e confiança depositadas em mim.

Aos membros da banca examinadora pelas correções e sugestões que tanto contribuem e acrescentam ao trabalho.

À pesquisadora Caroline Mellinger e à prof<sup>a</sup> Maria Ivone Barbosa pela participação e pela contribuição na banca de qualificação.

À professora Rosana Reis pela orientação durante as atividades do REUNI e à prof<sup>a</sup> Gesilene Oliveira pela orientação durante atividades do REUNI e do estágio docente. Obrigada pelo apoio, compreensão, incentivo e compartilhamento de conhecimentos acadêmicos e experiências de vida.

À pesquisadora Renata Tonon pelo apoio, “socorro”, acolhimento, paciência e pelas valiosas contribuições prestadas.

À pesquisadora Rosemar Antoniassi por ter sido a primeira pessoa a abrir as portas e permitir minha entrada no mundo da pesquisa científica. À Andressa Moreira, Cristiane Sobrinho, Marcelly Santos, Marco Antônio Silva, Míriam Malto e Rodrigo Campos por todo o suporte de laboratório nesses meus primeiros passos.

Ao pessoal da Planta II, minha casa na Embrapa Agroindústria de Alimentos durante o mestrado. À pesquisadora Lourdes Cabral por permitir a execução deste projeto, aos funcionários Luiz Fernando Silva (Chorão) por me auxiliar nos processos de separação por membranas e tratamento das imagens dos artigos, ao Sérgio Macedo (Filé) pela imensa boa vontade e auxílio, à Flávia Gomes e William pela colaboração. Aos colegas e amigos Adilson (Já é), Ana Paula Gil, André Souza, Bianca Alves, Cássia Soares, Cátia Lobo, Cinthia Carvalho, Crislen, Diego Paim, Flávia Monteiro (Pingo), Juliana Vilar, Larissa Costa, Leilson, Luísa Ozório, Mariana Sansão, Marlon, Milene, Mônica Pagani, Natália Eitel, Priscila Costa (Perê), Rafaela Nascimento, Rodrigo, Rozana Lima, Tainá, Tatiana Candea, obrigada a todos pela força, incentivo, pelas dicas, colaboração em análises e procedimentos e por tornarem o trabalho bem mais divertido.

Ao funcionário Hildomar Aguiar pelo auxílio na logística de obtenção do soro *in natura*.

Ao laboratório de Bioquímica, minha segunda casa na Embrapa Agroindústria de Alimentos, por ter aberto suas portas e me acolhido com tanto carinho. Obrigada às pesquisadoras Marília Stephan e Caroline Mellinger pelo conhecimento compartilhado e pelo auxílio na interpretação dos resultados obtidos na caracterização e quantificação das proteínas, assim como aos funcionários Alexsandro Santos e Tatiana Azevedo pelo treinamento e auxílio na execução das análises. Às estagiárias Jeniffer, Mariane, Larrysa e Rafaela pela ajuda na organização do laboratório, pelo preparo de reagentes e disponibilização de vidrarias sempre limpas.

Ao laboratório de Microbiologia por ter participado de uma etapa importante do trabalho e pela disponibilização de suas instalações, equipamentos e pessoal. Obrigada à pesquisadora Ana Lúcia Penteadó, às funcionárias Ana Paula Ribeiro, Simone Costa e Vanessa Fiuza pelo auxílio no planejamento e execução dos testes além da organização milimétrica do ambiente de trabalho. Agradeço à mestranda Natália Boia pela sugestão na escolha do método e por compartilhar suas impressões sobre a metodologia utilizada.

Ao pessoal da Planta V por disponibilizar o uso do fluorímetro, em especial à funcionária Henriqueta Barboza e à doutoranda Alexandra Mamede pelo auxílio na condução das análises de atividade antioxidante.

Ao pessoal da UFRuralRJ, aos professores e funcionários do DTA, em especial à Ivanilda e ao Juarez, técnicos do laboratório, à doutoranda Kamila Nascimento, aos alunos de iniciação científica Marcus Stanford e Rafael Cavalcante e ao funcionário Júlio. Obrigada por todo auxílio prestado.

Aos amigos e colegas de turma pela solidariedade, compreensão, compartilhamento de experiências, informações e sugestões, pelos momentos de estudo, risadas, confidências, serões no laboratório, lembretes valiosos e muito aprendizado. Em especial: Arturo Meléndez, Bebel Souza, Dílson Ribeiro, Fabiana Reis, Jhonny William, Júlio Carvalho, Laís Fontoura, Letícia Scotelano, Michele Paula, Micheli Ferreira, Nídia Barros, Rosiane Bonfim, Simone Nascimento, Victor Cypriano. Obrigada por tornarem a caminhada mais leve, divertida e enriquecedora.

À minha vizinha em Seropédica, Patrícia Souza pelas tardes agradáveis na sorveteria, por compartilhar toda tensão dos relatórios REUNI, por me fazer rir das situações mais inusitadas.

Ao colega Davy Hidálgo pelo auxílio na análise estatística.

À Capes/REUNI pelo suporte financeiro através da concessão de bolsa de mestrado.

Às empresas Alibra Ingredientes, Laticínio Sítio Solidão e Tovani Benzaquen pela doação de soro de queijo em pó, soro de queijo *in natura* e as enzimas Alcalase e Flavourzyme respectivamente. Em especial ao Sítio Solidão nas pessoas de Bernardo Menezes e Maeve Menezes pela disposição em auxiliar neste projeto.

Aos velhos e queridos amigos de sempre e pra sempre: Adriana Gomes, André Censi, Cris Frauches, Danielle Lima, Fabiano Pereira, Flávio Laplace, Francisco Veríssimo, Gabriele Carvalho, Isabela Couto, Iwine Joyce, José Antônio, Kelly Silva, Leonardo Rocha, Ligia Caroline, Maquilene Araújo, Mário Santos, Renata Martins e em especial, à Iara Duprat Duarte, grande incentivadora e quem me acompanhou constantemente nesse embarque no mundo da pós-graduação. Obrigada a todos pelo carinho, amizade, compreensão, confiança, incentivo, força e por tornar a vida mais leve, linda e iluminada (“Friends are the sunshine of life”).

À família querida e amada, física e espiritual, por estar presente nos bons e maus momentos, por confiarem nas minhas potencialidades e não duvidarem disso um momento sequer, sendo meu porto seguro onde quer que eu me encontre.

Aos espíritos amigos que estão sempre guiando meu caminho e me intuindo nos momentos mais decisivos.

À todos que colaboraram direta e indiretamente na elaboração deste trabalho e que por um lapso de memória não foram citados. MUITO OBRIGADA !!!

## RESUMO

SOUZA, Renata Silva Cabral de. **Avaliação do potencial antioxidante e antimicrobiano de proteínas do soro de leite concentradas por membranas e hidrolisadas por diferentes enzimas comerciais.** 2013. 70 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

A proposta do presente trabalho foi avaliar a concentração das proteínas do soro de leite bovino por ultrafiltração e posterior obtenção de hidrolisados proteicos deste concentrado via hidrólise enzimática visando obter peptídeos bioativos com potencial atividade antimicrobiana e antioxidante. Para concentração das proteínas do soro foi utilizada membrana cerâmica de ultrafiltração com massa molar de corte de 10-20 kDa, pressão aplicada à membrana de 5 bar, temperaturas testadas (30 °C, 40 °C e 50 °C). A temperatura ótima selecionada foi de 40 °C. O Fator de Concentração Volumétrica foi o parâmetro utilizado para indicar o final do processo de ultrafiltração sendo fixado em duas vezes o volume inicial da alimentação. Na temperatura de 40 °C foi obtida correspondência entre a concentração volumétrica e a concentração proteica final na fração retida pela UF, que também foi o dobro da encontrada na fração alimentação, avaliada pelo método de Bradford. Foram testadas duas enzimas comerciais: Alcalase, Flavourzyme e uma mistura equivalente de ambas, na proporção 50:50 (m/m) na reação de hidrólise. As condições de reação enzimática foram determinadas de acordo com instruções do fabricante e corroboradas por outros estudos em: 60 °C, pH 8 para Alcalase; 50 °C, pH 7 para Flavourzyme; 50 °C, pH 8 para mistura enzimática e relação enzima/substrato (g/g) foi de 5/100 para todas as enzimas. A reação de hidrólise foi monitorada pelo método pH Stat. Os Graus de Hidrólise (GH) finais alcançados foram de 15 %, 52 % e 63 % para Flavourzyme, mistura enzimática e Alcalase, respectivamente. Foram coletadas cinco alíquotas correspondentes a diferentes GH ao longo da reação para cada condição enzimática utilizada e avaliadas quanto a atividade antioxidante pelos métodos ABTS e ORAC tendo valores entre 597 a 1092  $\mu\text{M TE}$  (ABTS) e 1615 a 2920  $\mu\text{M TE}$  (ORAC) para Flavourzyme, 998 a 6290  $\mu\text{M TE}$  (ABTS) e 3092 a 7567  $\mu\text{M TE}$  (ORAC) para Alcalase e por fim, 913 a 2678  $\mu\text{M TE}$  (ABTS) e 2547 a 5903  $\mu\text{M TE}$  (ORAC) para a mistura enzimática. Nenhuma das amostras de hidrolisado com diferentes GH apresentou atividade antimicrobiana contra cepas de *Salmonella choleraesuis subsp. Enteritidis* (ATCC 13076) e *Listeria monocytogenes* (ATCC 9117).

**Palavras-chave:** Alcalase, Flavourzyme, grau de hidrólise, hidrolisados proteicos, soroproteínas, ultrafiltração

## ABSTRACT

SOUZA, Renata Silva Cabral de. **Evaluation of potential antioxidant and antimicrobial activities of whey proteins concentrated by membranes and hydrolyzed by different commercial enzymes.** 2013. 70 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

The aim of this study was to evaluate the process of protein concentration in bovine whey proteins by ultrafiltration process and subsequently the protein hydrolysate obtained by enzymatic hydrolysis to produce bioactive peptides with potential antimicrobial and antioxidant activities. For concentration process was used a ceramic ultrafiltration membrane with a molecular range cut-off of 10-20 kDa, transmembrane pressure of 5 bar and, temperature of 30 °C, 40 °C and 50 °C. The optimum temperature condition was at 40 °C. The Volume Concentrate Factor (VCF) parameter was used as a end-point of the ultrafiltration process and fixed at 2, corresponding on concentrating the initial volume twice, in volume. At the temperature of 40 °C, VCF had a correspondence on final protein concentration on the concentrated fraction by ultrafiltration and confirmed by Bradford method. Two commercial enzymes were tested Alcalase, Flavourzyme and an equivalent mixture of both 50:50 (w/w) in the hydrolysis reaction. The hydrolysis conditions were determined according to manufacturer instructions and confirmed by other studies: 60 °C and pH 8 for Alcalase; 50 °C and pH 7 for Flavourzyme; 50 °C and pH 8 for enzyme mixture with enzyme / substrate ratio (w / w) 5/100 for all enzymes. The reaction was monitored by pH Stat method. The final Degree of Hydrolysis (DH) achieved was 15%, 52% and 63% for Flavourzyme, Alcalase and enzyme mixture, respectively. Five aliquots were collected along the hydrolysis for each enzyme reaction corresponding to different DH in order to evaluate the antioxidant activity by ORAC and ABTS assays with final values between 597-1092 µM TE (ABTS) and from 1615 to 2920 µM TE (ORAC) for Flavourzyme; 998-6290 µM TE (ABTS) and 3092-7567 µM TE (ORAC) for Alcalase and finally 913-2678 µM TE (ABTS) and 2547-5903 µM TE (ORAC) for the enzyme mixture. The samples from all hydrolysates showed no antimicrobial activity against strains of *Salmonella choleraesuis* subsp. *Enteritidis* (ATCC 13076) and *Listeria monocytogenes* (ATCC 9117).

**Key words:** Alcalase, Flavourzyme hydrolysis degree, protein hydrolysates, whey proteins, ultrafiltration

## LISTA DE ABREVIACOES E SMBOLOS

<b>A</b>	Área de filtração da membrana
<b>a</b>	Coefficiente angular
<b>A1, A2, A3, A4, A5</b>	Alíquotas dos hidrolisados da Alcalase
<b>AAPH</b>	Dicloridrato de 2,2, Azobis (2- metilpropionamida)
<b>ABTS</b>	Ácido 2,2 azino bis (3 –etilbenzotiazolina- ácido 6 sulfônico
<b>ABTS<sup>+</sup></b>	Cátion ABTS
<b>AL</b>	Alimentação
<b>ANOVA</b>	<i>Analysis of Variance</i>
<b>AUC<sub>amostra</sub></b>	Área abaixo da curva do decaimento da fluorescência para a amostra
<b>AUC<sub>branco</sub></b>	Área abaixo da curva do decaimento da fluorescência para o branco
<b>AUC<sub>Trolox</sub></b>	Área abaixo da curva do decaimento da fluorescência para o padrão de Trolox
<b>b</b>	Coefficiente linear
<b>b.u (%)</b>	Base úmida
<b>BSA</b>	<i>Bovine Serum Albumin</i>
<b>C<sub>a</sub></b>	Concentração na alimentação (Eq. 3)
<b>CLAE</b>	Cromatografia Líquida de Alta Resolução
<b>C<sub>p</sub></b>	Concentração no permeado (Eq. 3)
<b>C<sub>p</sub></b>	Concentração de proteínas (Eq. 9)
<b>CPS</b>	Concentrado Proteico de Soro de Leite
<b>C<sub>r</sub></b>	Concentração no retido
<b>C<sub>T</sub> (µM)</b>	Concentração de Trolox
<b>D</b>	Diálise
<b>DBO</b>	Demanda Bioquímica de Oxignio
<b>DQO</b>	Demanda Química de Oxignio
<b>E/S</b>	Razão enzima/substrato
<b>ECA</b>	Enzima conversora da Angiotensina
<b>ERO</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>F1, F2, F3, F4, F5</b>	Alíquotas dos hidrolisados da Flavourzyme
<b>FAO</b>	<i>Food and Agriculture Organization</i>

<b>FCV</b>	Fator de Concentração Volumétrica (Eq. 2)
<b>GH</b>	Grau de Hidrólise
<b>GH<sub>c</sub></b>	Grau de hidrólise para coleta de alíquota
<b>GH<sub>final</sub></b>	Grau de Hidrólise obtido ao final da reação
<b>GRAS</b>	<i>Generally Recognized as Safe</i>
<b>h</b>	Nº de ligações peptídicas hidrolisadas
<b>h<sub>total</sub></b>	Nº de ligações peptídicas antes da reação de hidrólise
<b>Ig</b>	Imunoglobulinas
<b>IPS</b>	Isolado Proteico de Soro de Leite
<b>J (kg/hm<sup>2</sup>)</b>	Fluxo de permeado
<b>K</b>	Kelvin
<b>kDa</b>	Kilo Dalton
<b>Lf</b>	Lactoferrina
<b>LPO</b>	Lactoperoxidase
<b>M1, M2, M3, M4, M5</b>	Alíquotas dos hidrolisados da mistura enzimática
<b>MF</b>	Microfiltração
<b>MP</b>	Massa de proteína
<b>N<sub>b</sub></b>	Normalidade da base utilizada no controle do pH na reação de hidrólise
<b>NF</b>	Nanofiltração
<b>NPU</b>	<i>Net Protein Utilization</i>
<b>OH</b>	Hidroxila
<b>OI</b>	Osmose Inversa
<b>ORAC</b>	<i>Oxygen Radical Antioxidant Capacity</i>
<b>PD</b>	Protein Digestibility
<b>PDCASS</b>	Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score
<b>PE</b>	Permeado
<b>PER</b>	<i>Protein Efficiency Ratio</i>
<b>PG</b>	Permeação de Gases
<b>pK</b>	Constante de ionização
<b>PSM</b>	Processos de Separação por Membranas
<b>PV</b>	Pervaporação
<b>R</b>	Coefficiente de rejeição (Eq. 3)

<b>RE</b>	Retido
<b>ROO•</b>	Radical Peroxil
<b>SDS-PAGE</b>	<i>Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
<b>SH</b>	Sulfidrila
<b>t</b>	Tempo
<b>T</b>	Temperatura
<b>TCA</b>	Ácido tricloroacético
<b>TEAC</b>	<i>Trolox equivalent antioxidant capacity</i>
<b>TEMED</b>	Tetrametiletilenodiamina
<b>Trolox</b>	Ácido 6- hidroxí – 2- 5- 7- 8 tetrametilcromo 2- carboxílico
<b>TSA</b>	<i>Tryptic Soy Agar</i>
<b>TSAYE</b>	<i>Tryptic Soy Agar Yeast Extract</i>
<b>UF</b>	Ultrafiltração
<b>UFC</b>	Unidades formadoras de colônia
<b>V</b>	Volume de permeado coletado num espaço de tempo (Eq. 1)
<b>V<sub>a</sub></b>	Volume de alimentação
<b>VB</b>	Valor Biológico
<b>V<sub>b</sub></b>	Volume de base consumido na reação de hidrólise
<b>V<sub>p</sub></b>	Volume de permeado
<b>WHO</b>	World Health Organization
<b>Δp</b>	Pressão aplicada à membrana
<b>α</b>	Grau de dissociação dos grupamentos amino e carboxi terminal
<b>α La</b>	Alfa Lactalbumina
<b>β Lg</b>	Beta Lactoglobulina

## LISTA DE FIGURAS, TABELAS E QUADROS

- Figura 1** – Estrutura tridimensional da  $\beta$ -lactoglobulina bovina 6
- Figura 2** – Estrutura tridimensional de  $\alpha$ -Lactalbumina humana 6
- Figura 3** - Etapas de formação dos produtos na hidrólise enzimática 14
- Figura 4** – Processo de formação de poros na membrana celular microbiana modelo chamado de “barril” (a) aproximação de diversos peptídeos na superfície da membrana celular; (b) em seguida, inúmeros peptídeos se depositam na superfície; (c) as hélices dos peptídeos são inseridas na porção hidrofóbica da membrana com a adição de mais peptídeos há um crescimento do tamanho do poro formado, o que causa extravasamento de conteúdo citoplasmático; (d) morte celular 20
- Figura 5** – Processo de ruptura da membrana celular microbiana modelo chamado de “tapete”. De acordo com o modelo, os peptídeos estão em contato preferencial com a porção hidrofílica da bicamada lipídica da membrana durante todo o processo (a) aproximação dos peptídeos na superfície da membrana; (b) alinhamento dos monômeros de peptídeos na superfície da membrana, de modo que os resíduos hidrofílicos fiquem em contato com a extremidade hidrofílica da bicamada; (c) os peptídeos se reorientam em direção à porção hidrofóbica; (d) ruptura da membrana e desintegração da conformação de bicamada fosfolipídica. 21
- Figura 6** – Geometria plana – (i) módulo placa-quadro e (ii) módulo em espiral 23
- Figura 7** – Geometria cilíndrica – (i) módulo fibra-oca e (ii) módulo tubular 24
- Figura 8** - PSM que utilizam gradiente de pressão como força motriz 27
- Figura 9** - Fluxograma das etapas realizadas no presente trabalho iniciando com a reconstituição do concentrado proteico do soro em pó, seguida do processo de ultrafiltração. Com a fração concentrada por UF realizou-se a hidrólise com as diferentes enzimas obtendo diferentes alíquotas submetidas à análise de atividade antioxidante e antimicrobiana e à eletroforese Tricina SDS – PAGE para avaliar a formação de peptídeos. 31
- Figura 10** – Esquema do processo de UF do concentrado proteico de soro de leite reconstituído. (1) Tanque de alimentação; (2) Bomba; (3) Manômetro - controla pressão de entrada; (4) Módulo de membranas tubulares; (5) Manômetro – controla pressão de saída. 32
- Figura 11** - Fluxograma da limpeza do sistema de UF em suas diversas etapas. 33
- Figura 12** – Esquema de hidrólise pelo método pH - Stat 34
- Figura 13** - Evolução do fluxo permeado e do Fator de Concentração Volumétrica. Onde: Fluxo de permeado (J) e Fator de Concentração Volumétrica (FCV) ao longo da ultrafiltração

do soro reconstituído nas três diferentes temperaturas testadas. Linha contínua: (J); Linha pontilhada: (FCV). 41

**Figura 14** - Gráfico comparativo das duplicatas da ultrafiltração do soro reconstituído na temperatura de 40 °C. Onde: Fluxo de permeado (J) e Fator de Concentração Volumétrica (FCV). Linha contínua: (J) e linha pontilhada (FCV) 44

**Figura 15** – Curvas de cinética de hidrólise enzimática das proteínas do soro de leite com as diferentes enzimas comerciais e a mistura enzimática. 45

**Figura 16** - Perfil eletroforético (Eletroforese SDS-PAGE) típico das proteínas do soro de leite. Frações submetidas à UF. Onde Padrão (1), Alimentação (A), Retido (R) e Permeado (P). 47

**Figura 17** - Perfil eletroforético (Tricina SDS – PAGE) de hidrolisados proteicos de soro de leite com a enzima Alcalase. Onde: Padrão de ultra baixo peso molecular Sigma Aldrich (P), (A1, A2, A3, A4, A5) alíquotas do hidrolisado com a enzima Alcalase. 48

**Figura 18** - Perfil eletroforético (Tricina SDS – PAGE) de hidrolisados proteicos de soro de leite com a enzima Flavourzyme. Onde: Padrão de ultra baixo peso molecular Sigma Aldrich (P), (F1, F2, F3, F4, F5) alíquotas do hidrolisado com a enzima Flavourzyme. 49

**Figura 19** - Perfil eletroforético (Tricina SDS – PAGE) de hidrolisados proteicos de soro de leite com a mistura enzimática. Onde: Padrão de ultra baixo peso molecular Sigma Aldrich (P), alíquotas do hidrolisado com a mistura enzimática (M1, M2, M3, M4, M5). 50

**Figura 20** - Perfil eletroforético (Tricina SDS-PAGE) de amostras de soro de leite hidrolisado. Onde: Padrão ultra baixo Sigma Aldrich (P), alíquotas do hidrolisado com a enzima Alcalase A2, A3, A4, A5 e alíquotas do hidrolisado da mistura enzimática M2, M3, M4, M5. 51

**Figura 21** – Gráfico da atividade antioxidante pelo método ABTS de acordo com a concentração estimada de peptídeos com base na concentração de tirosina das diferentes alíquotas com diferentes graus de hidrólise para as diferentes enzimas. 54

**Figura 22** - Gráfico da atividade antioxidante pelo método ORAC de acordo com a concentração estimada de peptídeos com base na concentração de tirosina das diferentes alíquotas com diferentes graus de hidrólise para as diferentes enzimas. 54

**Figura 23** – Placa contendo meio de cultura bacteriano. Controle positivo (1), controle negativo (2) e demais poços com amostras de hidrolisado proteico de soro de leite. 57

**Figura 24** – Diferentes replicatas das curvas de cinética de hidrólise enzimática das proteínas do soro de leite com a enzima Alcalase. 69

<b>Figura 25</b> – Diferentes replicatas das curvas de cinética de hidrólise enzimática das proteínas do soro de leite com a enzima Flavourzyme.	70
<b>Figura 26</b> - Diferentes duplicatas das curvas de cinética de hidrólise enzimática das proteínas do soro de leite com a mistura enzimática.	70
<b>Quadro 1</b> - Parâmetros utilizados para expressar qualidade proteica	8
<b>Quadro 2</b> - Composição em aminoácidos e sua relação com atividade antioxidante	19
<b>Tabela 1</b> - Composição de soro de leite bovino	4
<b>Tabela 2</b> - Condições de hidrólise enzimática das proteínas do soro de leite de acordo com a enzima utilizada	33
<b>Tabela 3</b> – Fluxo médio de permeado da UF do soro de leite nas diferentes temperaturas	70
<b>Tabela 4</b> – Fator de concentração volumétrica (FCV) e tempo final de processo obtido em cada temperatura testada.	42
<b>Tabela 5</b> – Concentração de proteína nas diferentes frações obtidas no PSM nas três temperaturas testadas.	43
<b>Tabela 6</b> – Concentração de peptídeos nas alíquotas de hidrolisados utilizados na avaliação da atividade antimicrobiana.	58

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>2</b>
2.1 Objetivo Geral	2
2.2 Objetivos Específicos	2
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>3</b>
3.1 Soro de Leite	3
3.1.1 Principais Componentes do Soro de Leite	4
3.1.2 Caracterização das Proteínas do Soro	5
3.1.3 Propriedades nutricionais das proteínas do soro de leite	7
3.1.4 Propriedades funcionais das proteínas do soro de leite	9
3.1.5 Produtos Comerciais derivados de Soro de Leite Bovino	10
3.2 Hidrólise Proteica	11
3.2.1 Aspectos gerais	11
3.2.2 Proteases	13
3.2.3 Hidrolisados Proteicos	13
3.3 Peptídeos Bioativos	15
3.3.1 Atividade antioxidante	17
3.3.2 Atividade antimicrobiana	20
3.4 Processo de Separação por Membranas (PSM)	21
3.4.1 Aspectos gerais	21
3.4.2 Caracterização das membranas	22
3.4.3 Princípios do PSM	24
3.4.3.1 Fluxo de permeado	24
3.4.3.2 Seletividade	25
3.4.4 Operações utilizando membranas porosas	26
3.4.5 Vantagens da utilização de PSM	27

3.4.6 Aplicação de PSM na indústria	28
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>30</b>
4.1 Materiais	30
4.1.1 Matéria-prima	30
4.1.2 Membranas	30
4.1.3 Enzimas	30
4.2 Métodos	30
4.2.1 Processos	31
4.2.1.1 Concentração das proteínas do soro	31
4.2.1.2 Hidrólise Enzimática	33
4.2.2 Métodos Analíticos	36
4.2.2.1 Dosagem de proteínas pelo método de Bradford	36
4.2.2.2 Tricina SDS - PAGE ( <i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins</i> )	36
4.2.2.3 Estimativa da dosagem de peptídeos pelo método da tirosina	38
4.2.3 Avaliação da atividade antioxidante	38
4.2.4 Avaliação da atividade antimicrobiana	39
4.2.5 Análise estatística	40
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>41</b>
5.1 Concentração das proteínas do soro por UF	41
5.2 Hidrólise enzimática do soro de leite concentrado por UF	44
5.3 Atividade antioxidante	52
5.4 Atividade antimicrobiana	56
<b>6 CONCLUSÕES</b>	<b>59</b>
<b>7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS</b>	<b>60</b>
<b>8 REFERÊNCIAS</b>	<b>61</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>69</b>

# 1 INTRODUÇÃO

O setor de laticínios contribui de forma expressiva para economia de nosso país, ocupando o Brasil a quinta colocação entre os maiores produtores mundiais de leite. Em 2007, o volume de leite utilizado somente com a fabricação de queijos atingiu o volume de 6,3 bilhões de litros. A partir deste, tem-se concomitantemente a produção do soro de leite como coproduto. O soro de leite é a parte aquosa sobrenadante, obtida a partir da precipitação ou coagulação da caseína. Pode ser denominado soro ácido quando obtido pela coagulação ácida da caseína ou soro doce, quando obtido por processo enzimático, de acordo com o processo utilizado para elaboração do queijo.

O soro é um líquido que possui em sua composição água, lactose, sais minerais e proteínas solúveis. É um coproduto produzido em larga escala pela indústria de laticínios e devido ao seu alto teor de matéria orgânica e alta demanda química e bioquímica de oxigênio (DQO e DBO) é um potencial poluidor de ambientes aquáticos quando descartado de forma inadequada.

Quando desidratado, possui entre 12 a 14% de proteína de alto valor biológico e de alta aplicabilidade na indústria. Na indústria alimentícia, é utilizada em diversos produtos conferindo propriedade gelificante, estabilizante, emulsificante, espumante, propriedades funcionais e participando como ingrediente de pães, bolos e bebidas lácteas. Na indústria farmacêutica, esta fração é utilizada devido aos efeitos benéficos à fisiologia humana como função antioxidante, antimicrobiana, hipotensora e protetora do sistema cardiovascular.

Diante das inúmeras aplicações avaliadas para o soro de leite, busca-se cada vez mais a diversificação dos processos aos quais serão submetidos este coproduto da indústria de laticínios, no intuito de reduzir o impacto que este pode causar ao meio ambiente; agregar valor a este subproduto; e principalmente, usufruir de suas excelentes características tecnológicas, fisiológicas e funcionais, explorando seu grande potencial para utilização na indústria.

Dentre as diferentes alternativas existentes, a obtenção de hidrolisados e sua concentração pelo processo de separação por membranas se destacam devido à maior concentração dos componentes desejados, garantia de segurança microbiológica do produto, menor poder alergênico, maior facilidade de transporte e armazenamento, maior especificidade na obtenção das frações proteicas com determinada massa molar e melhores condições de aplicabilidade na indústria.

A proposta do presente trabalho foi avaliar a obtenção de hidrolisados proteicos de soro de leite utilizando a via enzimática, monitorada pelo método pH Stat, visando obter peptídeos bioativos com potencial atividade antimicrobiana e antioxidante. Através deste processo, busca-se viabilizar uma alternativa para o aproveitamento e agregação de valor a este coproduto, que poderá futuramente ser utilizado como ingrediente e matéria-prima pela indústria.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Obter peptídeos bioativos a partir das proteínas de soro de leite concentradas e hidrolisadas via enzimática.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Concentrar as proteínas do soro de leite por processo de separação por membranas;
- Avaliar a melhor condição de concentração das proteínas do soro;
- Hidrolisar enzimaticamente as proteínas do soro de leite concentrado a fim de se obter peptídeos bioativos;
- Monitorar o processo de hidrólise por Tricina SDS-PAGE;
- Avaliar a influência do uso de enzimas de diferentes categorias, endopeptidase e exopeptidase, e dos diferentes graus de hidrólise alcançados na atividade antioxidante e antimicrobiana dos diferentes peptídeos obtidos;
- Avaliar a atividade antioxidante e antimicrobiana da fração concentrada e hidrolisada.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Soro de Leite

O soro de queijo, soro de leite ou lactosoro constitui a parte aquosa obtida a partir da fabricação convencional de queijo ou separação da caseína e é responsável por cerca de 85 a 90% do volume do leite. Retém em torno de 55% dos nutrientes presentes no leite e possui em sua composição proteínas solúveis, lactose, minerais, vitaminas e também quantidades variáveis de ácido lático e nitrogênio não solúvel (MIZUBUTI, 1994).

É classificado conforme sua obtenção, podendo ser “soro ácido”, quando a remoção da caseína é feita pela adição de ácido, ou “soro doce” pela adição da enzima renina, o que gera maior quantidade de peptídeos e aminoácidos livres (SGARBIERI, 1996). A fração protéica do soro corresponde a 20% do total de proteínas presentes no leite bovino, sendo a  $\alpha$ -lactalbumina e a  $\beta$ -lactoglobulina as majoritárias, numa porcentagem de 70-80% do total. Possui também soralbumina, imunoglobulinas, proteose-peptonas, lactoferrina, transferrina e enzimas (SGARBIERI, 1996). Em relação aos aminoácidos essenciais, há presença de todos estes em quantidades que atendem as exigências nutricionais de todas as idades, apresentando concentrações elevadas dos aminoácidos triptofano, cisteína, leucina, isoleucina e lisina (SGARBIERI, 2004).

Dentre os principais produtores mundiais de leite, o Brasil atingiu a quinta maior colocação no ano de 2009 com a produção de 29,1 mil toneladas (EMBRAPA CNPGL, 2011), demonstrando a importância e o destaque deste setor para economia de nosso país. Em 2007, somente com a produção de queijo, foram utilizados cerca de 6,3 bilhões de litros de leite (EMBRAPA CNPGL, 2011). Levando em consideração que para cada quilo de queijo produzido são gerados em média oito litros de soro, pode inferir-se que, no ano de 2007, a produção de soro alcançou cerca de cinco bilhões de litros. Este volume é bastante expressivo e aponta a necessidade de converter este resíduo agroindustrial em ingredientes que possam ser utilizados pela indústria alimentícia e farmacêutica devido às propriedades encontradas em seus constituintes.

O soro é o efluente gerado em maior volume nas indústrias de laticínios e seu descarte sem tratamento prévio causa sérias implicações para poluição ambiental. Isto é decorrente de sua composição rica em compostos orgânicos, principalmente proteínas e lactose, que possuem alta demanda bioquímica e química de oxigênio (DBO e DQO) (KOUTINAS et al., 2007). Esta alta DBO e DQO são as principais responsáveis pela eutrofização<sup>1</sup> de ambientes aquáticos. Com o crescente apelo pela maior preservação do ambiente, há um interesse progressivo por parte das empresas em adequar seus processos, além da pressão dos consumidores por produtos que gerem menor impacto ambiental. As principais alternativas para utilização do soro de leite no setor de alimentos são a elaboração de ricota e bebidas lácteas, soro concentrado, soro em pó e a utilização na forma “in natura” para alimentação animal (MACHADO et al., 2001).

---

<sup>1</sup> Eutrofização: Enriquecimento das águas por nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo, levando ao crescimento excessivo das plantas aquáticas. Este aumento da biomassa pode levar a uma diminuição do oxigênio dissolvido, provocando a morte e consequente decomposição de muitos organismos causando desequilíbrio do ecossistema aquático e progressiva degeneração da qualidade da água. (FIGUEIREDO et al., 2007).

Intensos estudos vêm sendo realizados no intuito de desenvolver alternativas tecnológicas para melhor aproveitamento deste coproduto e sua aplicação em diversos produtos e processos na indústria (KOUTINAS et al., 2009).

### 3.1.1 Principais Componentes do Soro de Leite

O soro de leite líquido é composto majoritariamente por água (93- 95%). O teor de sólidos totais encontra-se em torno de 6%. Na Tabela 1, verifica-se a composição média de diferentes tipos de soro, doce e ácido e sua comparação com a composição do leite bovino (ANTUNES, 2003).

**Tabela 1** - Composição de soro de leite bovino

Componente (% , bu)	Leite	Soro Doce	Soro Ácido
<b>Sólidos totais</b>	13,0	6,4	6,2
<b>Proteína</b>	3,6	0,8	0,75
<b>Gordura</b>	3,9	0,5	0,04
<b>Lactose</b>	4,6	4,6	4,2
<b>Cinzas</b>	0,8	0,5	0,8
<b>Ácido láctico</b>	-	0,05	0,4

Fonte: (ANTUNES, 2003) Onde b.u. = base úmida

A composição do soro apresenta variações sazonais e depende de fatores como a raça que compõe o rebanho bovino, estágio da lactação, variação durante ordenha, qualidade inicial do leite, tipo de tratamento ao qual este último é submetido (aquecimento, centrifugação, homogeneização), tipo de queijo produzido e procedimentos adotados para sua elaboração (pasteurização, pré-concentração, remoção de partículas de caseína), tendo estes fatores influencia na característica e composição final do soro de leite (ANTUNES, 2003; BALDASSO, 2008; GONZÁLEZ, DÜRR e FONTANELI, 2001).

A seguir são listados os principais componentes do soro de leite:

- **Lactose:** É o principal glicídeo presente no leite e é sintetizada a partir da glicose presente no sangue dos mamíferos. É um dissacarídeo formado por unidades de glicose e galactose e possui papel importante na síntese do leite. A lactose atua como principal fator osmótico e comanda a entrada de água nas células epiteliais mamárias sendo a principal responsável pela quantidade de água drenada para o leite (GONZÁLEZ, DÜRR e FONTANELI, 2001).
- **Sais minerais e vitaminas:** Os principais minerais presentes no leite são cálcio e fósforo, no entanto estes estão intimamente ligados à estrutura em micelas da caseína,

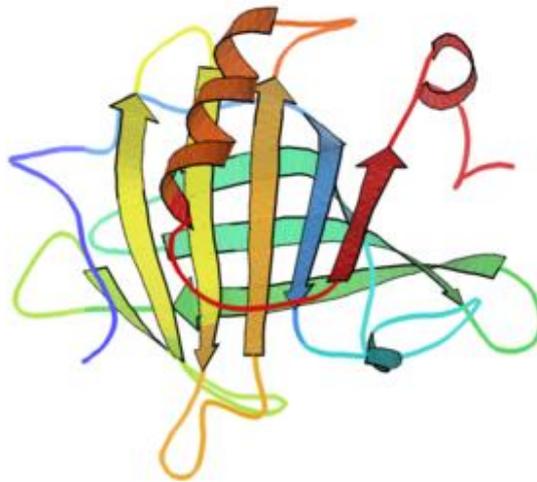
tendo no soro sua quantidade diminuída (GONZÁLEZ, DÜRR e FONTANELI, 2001). Já as principais vitaminas encontradas no soro são as hidrossolúveis como vitamina B12, vitamina B6, ácido pantotênico, riboflavina, tiamina, vitamina C; e lipossolúvel somente o retinol (vitamina A) (LAGRANGE e DALLAS, 1997; MILLER et al., 2000 apud BALDASSO, 2008).

- **Proteínas:** Podem ser oriundas da síntese nas células epiteliais das glândulas mamárias (caseína,  $\alpha$ -lactalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina) ou absorvidas do sangue como a albumina sérica e a imunoglobulina (esta última também pode ser sintetizada em pequenas quantidades por linfócitos presentes no tecido mamário). Os precursores para a síntese proteica do leite são aminoácidos livres do sangue (90%) e proteínas séricas (10%). Após a retirada da caseína, as proteínas restantes em solução são por definição denominadas de proteínas do soro. Estas variam de acordo com a espécie animal, estágio de lactação, presença de infecções intramamárias, dentre outros fatores (GONZÁLEZ, DÜRR e FONTANELI, 2001).

### 3.1.2. Caracterização das Proteínas do Soro

As proteínas do soro de leite apresentam estrutura globular contendo pontes de dissulfeto, o que lhes confere certo grau de estabilidade estrutural. As frações protéicas, descritas a seguir, são compostas de  $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactalbumina, albumina do soro bovino, imunoglobulinas, lactoferrina e lactoperoxidase e glicomacropéptido. Estas variam em tamanho, massa molecular e função, conferindo propriedades específicas às proteínas do soro (SGARBIERI, 1996; HARAGUCHI, 2006).

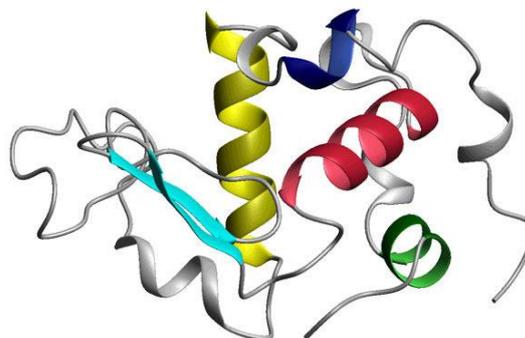
- **$\beta$  Lactoglobulina ( $\beta$  -Lg):** É a proteína presente em maior proporção no soro de leite bovino, representando 50% das proteínas totais no material. Sua estrutura química é composta por 162 aminoácidos e apresenta 15% de ligações tipo  $\alpha$ -hélice, 43% de ligações tipo folha beta e 47% de sua estrutura estão de forma não organizada, sendo sensível a pH e temperatura (ANTUNES, 2003). Sua estrutura tridimensional está apresentada na Figura 1. Em pH acima do ponto isoelétrico ( $pI = 5,2$ ), a  $\beta$ -lactoglobulina encontra-se na forma de dímero, com peso molecular aproximado de 36 kDa; em pH abaixo de 3,5 e acima de 7,5 há dissociação e a proteína apresenta-se na forma monomérica; na faixa de pH entre 3,5 a 5,2 o dímero se polimeriza e origina um octômero com peso molecular de 147 kDa (ANTUNES, 2003). É parcialmente resistente à ação de ácidos e enzimas proteolíticas e rico em aminoácidos de cadeia ramificada e seu peso molecular varia pela polimerização entre 18 e 36 kDa (HARAGUCHI, 2006). A exposição à temperatura acima de 70°C gera alterações extensivas nesta proteína ocorrendo exposição de seus grupamentos amino ( $NH_2$ ) e sulfidril (SH), com consequente desnaturação e polimerização irreversíveis devido à formação de ligações S-S, as pontes dissulfeto, intermoleculares (ANTUNES, 2003).



**Figura 1** – Estrutura tridimensional da  $\beta$ -lactoglobulina bovina

(Fonte: [http://www.fcub-era.rs/research\\_groups/rg1/rg1.shtml](http://www.fcub-era.rs/research_groups/rg1/rg1.shtml))

- **$\alpha$  Lactalbumina ( $\alpha$ -La):** É o componente que representa a segunda maior fração proteica do soro (15- 25% das proteínas totais), com massa molecular de 14 kDa e de fácil e rápida digestão, rica em triptofano, lisina, treonina, leucina e cisteína. Esta fração afeta positivamente a absorção de minerais e é responsável pela ação antimicrobiana em *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae* (HARAGUCHI, 2006). Sua estrutura tridimensional pode ser visualizada na Figura 2.



**Figura 2** - Estrutura tridimensional de  $\alpha$ -lactalbumina humana

(Fonte: <http://www.acsu.buffalo.edu/~andersh/research/milkcancer.asp>)

- **Albumina do soro bovino (BSA):** É uma proteína globular, idêntica à albumina isolada de soro sanguíneo, com cadeia polipeptídica contendo cerca de 582 resíduos de

aminoácidos e massa molecular de 69 kDa. Possui função de carreadora de ácidos graxos insolúveis no sistema circulatório, o que auxilia na manutenção de sua estabilidade, evitando a desnaturação. Também pode ligar-se a outros lipídeos e a substâncias responsáveis por *flavor* (ANTUNES, 2003). Segundo Haraguchi (2006), a BSA atua como relevante precursor da síntese de glutathiona, tripeptídeo conhecido pela atividade antioxidante.

- **Imunoglobulinas (Ig):** São classificadas como glicoproteínas, com massa molecular que varia de 15 a 1000 kDa. São formadas por monômeros de duas cadeias polipeptídicas de 20 kDa, cadeias leves, e duas cadeias polipeptídicas de 50 a 70 kDa, cadeias pesadas, unidas por ligações dissulfeto. O soro contém de 0,6 a 1,0 g/L de Ig (MORR e HA, 1993 apud TARDIOLI, 2003). A esta fração proteica, que possui peptídeos de alto massa molecular, atribui-se a propriedade de atividade antioxidante (HARAGUCHI, 2006). São proteínas bastantes termolábeis (ANTUNES, 2003).
- **Lactoferrina (Lf):** Importante proteína presente no soro de leite, encontra-se ligada ao elemento ferro, tornando este inacessível aos microrganismos. Apresenta massa molecular da ordem de 76 kDa e polimeriza-se rapidamente na presença de íons cálcio. Apresenta propriedades bacteriostáticas, atuando como efetivo inibidor do crescimento bacteriano (inibe crescimento de enterobactérias patogênicas), atividade antiviral, imunomodulatória, cicatrizante, anti-inflamatória, efeito anticâncer, atividade antioxidante (WALZEM, 1999; ANTUNES, 2003).
- **Lactoperoxidase (LPO):** É uma enzima que degrada o peróxido de hidrogênio e apresenta propriedades antibacterianas. Esta fração é considerada um componente funcional de produtos de soro. A lactoperoxidase tem sido objeto de vários estudos visando sua utilização como meio de controlar o desenvolvimento da acidez e mudanças de pH durante a estocagem refrigerada de iogurte e quanto à possibilidade de ser utilizada como conservante natural. Em combinação com outros conservantes, a lactoperoxidase é usada como ingrediente em pasta de dente para combater cáries (WALZEM, 1999).

### 3.1.3. Propriedades nutricionais das proteínas do soro de leite

As propriedades nutricionais de um alimento são definidas pela sua riqueza em nutrientes essenciais, ou seja, que não são sintetizados pelo organismo e precisam ser obtidos através da alimentação, pela biodisponibilidade desses nutrientes e pela ausência de substâncias tóxicas e/ou antinutricionais (SGARBIERI, 1996).

As proteínas diferem em seu valor nutritivo sendo o conteúdo em aminoácidos essenciais e a digestibilidade os fatores que mais contribuem para essa diversidade. A qualidade nutricional de uma proteína, ou mistura proteica, é ideal quando apresenta todos os aminoácidos essenciais em proporções que resultem em taxa de crescimento e de

manutenção da saúde satisfatórias as diferentes faixas etárias (FENNEMA, DAMODARAN e PARKIN, 2010).

Quando uma proteína apresenta adequado balanço entre o tipo e a quantidade de aminoácidos essenciais, alta digestibilidade e utilização eficaz pelo organismo, estamos diante da chamada *proteína de referência*. Quando temos um aminoácido essencial cuja concentração encontra-se abaixo da encontrada em uma proteína de referência este é denominado *aminoácido limitante* (BALDASSO, 2008; FENNEMA, DAMODARAN e PARKIN, 2010).

Com maior frequência, proteínas de origem vegetal apresentam deficiência em pelo menos um aminoácido essencial. Os aminoácidos mais comumente encontrados como limitantes são: lisina, treonina, triptofano e os sulfurados cisteína e metionina. No entanto, essas proteínas podem ter sua qualidade nutricional melhorada se misturadas a outras fontes ricas nesse aminoácido essencial (FENNEMA, DAMODARAN e PARKIN, 2010).

Outra estratégia capaz de manter as características nutricionais desejáveis das proteínas é a observância de fatores que afetam diretamente sua digestibilidade. Dentre os mais importantes temos: a estrutura conformacional da proteína, que influencia na hidrólise proteica realizada pelas proteases endógenas; presença de fatores antinutricionais, podendo inibir a clivagem da proteína, tendo como exemplos a inibição das enzimas endógenas tripsina e quimotripsina, responsáveis pela proteólise; e por último o processamento, onde variáveis como temperatura, pH e pressão a que são submetidas podem alterar positivamente ou negativamente a digestibilidade proteica (FENNEMA, DAMODARAN e PARKIN, 2010).

Os parâmetros mais comumente utilizados para expressar a qualidade proteica estão expostos no Quadro 1 (BALDASSO, 2008):

**Quadro 1** - Parâmetros utilizados para expressar qualidade proteica

<b>Parâmetro analisado</b>	<b>Conceito</b>
<b>Valor Biológico (VB)</b>	Porção de proteína retida e absorvida pelo organismo
<b>Digestibilidade Proteica (PD – Protein Digestibility)</b>	Porção da proteína do alimento absorvida
<b>Utilização Proteica Líquida (NPU – Net Protein Utilization)</b>	Porcentagem de nitrogênio ou proteína dietética que é retida
<b>Coefficiente de Eficácia Proteica (PER – Protein Efficiency Ratio)</b>	Ganho de massa obtido por grama de proteína consumida
<b>Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score (PDCAAS)</b>	Medida da digestibilidade e disponibilidade de aminoácidos essenciais

Fonte: Baldasso, 2008.

As proteínas do soro são de fácil digestão e seu perfil de aminoácidos essenciais atende ou supera todas as exigências qualitativas e quantitativas estabelecidas pela

Organização de Alimentos e Agricultura/ Organização Mundial de Saúde (*Food and Agriculture Organization/World Health Organization*, FAO/WHO) (WALZEM, 1999).

Segundo Sgarbieri (2004), as proteínas do soro de leite são altamente digeríveis e rapidamente absorvidas pelo organismo, apresentando metabolização rápida, e, portanto, recomendadas em situações onde a reposição imediata deste nutriente seja emergencial. Proteínas do soro também apresentam todos os aminoácidos essenciais em sua composição, tendo os aminoácidos triptofano, cisteína, leucina, isoleucina e lisina em concentrações bastante elevadas. Além disso, sua composição em aminoácidos favorece a síntese de proteínas musculares, tendo expressiva ação benéfica aos praticantes de exercícios físicos.

Várias funções ou atividades fisiológicas têm sido descobertas ou atribuídas às proteínas e aos peptídeos secundários do soro. Estes componentes podem aumentar a proteção passiva contra infecções; modular processos digestivos e metabólicos; e atuar como fatores de crescimento para diferentes tipos de células, tecidos e órgãos (WALZEM, 1999).

O tratamento enzimático possibilita um aumento no aproveitamento nutricional das proteínas. Hidrolisados proteicos são amplamente utilizados com finalidades terapêuticas, destinados a indivíduos que apresentam necessidades nutricionais específicas e não satisfeitas pela alimentação convencional. A hidrólise contribui para melhoria de propriedades físicas, químicas, funcionais e nutricionais das proteínas, atuando na absorção proteica. Fórmulas que contém elevado teor de oligopeptídeos, especialmente di e tripeptídeos, quando comparadas com uma mistura equivalente de aminoácidos livres apresentam maior efetividade de utilização e conseqüente aumento no valor nutritivo (AFONSO, 2008).

### **3.1.4 Propriedades funcionais das proteínas do soro de leite**

As características funcionais atribuídas às proteínas dependem basicamente de sua estrutura e função biológica. Fatores intrínsecos, como composição em aminoácidos, estrutura, carga, hidrofobicidade; e fatores extrínsecos, como temperatura, acidez, concentração e presença de sais ditam a funcionalidade das proteínas em seu estado nativo. O termo “propriedades funcionais”, segundo Wit (1998), é frequentemente utilizado em relação às propriedades físico-químicas das proteínas em solução aquosa, podendo sofrer variações devido a alguns fatores quando estas são adicionadas aos alimentos.

O soro se diferencia como um ingrediente de inovação em alimentos e bebidas devido à sua grande versatilidade. A variedade e funcionalidade de suas proteínas permitem a utilização para diversas aplicações em alimentos. As características funcionais de proteínas do soro refletem o modo como estas interagem com outros componentes de um produto alimentar (lipídeos, açúcares, sais, e mesmo outras proteínas), ou seja, o desempenho das proteínas quando adicionadas em produtos alimentícios. Essas interações vão depender também do processamento realizado no soro (homogeneização, aquecimento, congelamento, armazenamento) e dos efeitos causados por este na matéria-prima (BALDISSERA et al., 2011).

As proteínas do soro podem ser aplicadas como matéria-prima multifuncional para diversos fins (aeração, emulsificação, gelatinização e aumento de solubilidade) fornecendo um alimento com apelo no sabor, aparência e palatabilidade. Na grande parte de sua aplicação como ingrediente, utiliza-se a forma líquida, a forma de concentrado proteico do soro (CPS) ou ainda como isolado proteico do soro (IPS) (BALDISSERA et al., 2011).

### 3.1.5 Produtos Comerciais Derivados de Soro de Leite Bovino

A obtenção de produtos industrializados a partir de soro de leite é apontada como promissora alternativa para agregar valor a este coproduto. Segundo Peters (2005), a fonte de receita dessa atividade não é proveniente apenas da produção de isolados proteicos, pois simultaneamente, há produção de permeado rico em lactose, tornando necessário converter este componente em produto que possa ser comercializado. Ainda, de acordo com o mesmo autor, pode ser citado o processo de hidrólise enzimática na produção de isolados proteicos de soro com reduzido poder alergênico, o que pode aumentar o valor agregado deste coproduto em torno de 100%.

Uma série de aplicações para os componentes do soro de leite aumenta a demanda comercial destes produtos, expandindo o mercado. O interesse da indústria farmacêutica na aplicação dos componentes do soro, principalmente proteínas, como reguladores da pressão arterial e como indutores do sono, indica maior contribuição futura deste mercado para o aumento da demanda de produtos derivados do soro. O maior exemplo aplicado atualmente, correspondendo ao maior percentual de destinação dos produtos derivados de soro, está no uso em nutrição parenteral (PETERS, 2005).

A segurança microbiológica também é um fator que favorece a divulgação destes produtos. Os produtos comerciais obtidos a partir de proteínas do soro são considerados GRAS (*Generally Recognized as Safe*), ou seja, seguros para aplicação em produtos alimentícios. Possuem ainda o apelo de reduzidos riscos de contaminação em comparação com produtos desidratados obtidos a partir de ovos, devido à maior susceptibilidade de contaminação por *Salmonella sp* nestes últimos (SINHA, 2007; PETERS, 2005).

Segundo Antunes (2003) e Baldasso (2008), os produtos de soro comercialmente disponíveis tem as seguintes denominações e aplicações:

- **Soro em pó** – Obtido através da remoção de 95% da umidade do soro fluido e constituído de todos seus componentes nas proporções relativas à matéria-prima original. Dessa forma, o produto adquire maior vida de prateleira, reduz custos de transporte e mantém suas propriedades nutricionais. Na obtenção deste produto, uma série de operações é realizada dentre as quais: pré-concentração (por evaporação a 85°C ou por processo de separação por membranas) e secagem por atomização. Este produto é utilizado em salgadinhos, produtos de panificação, sorvetes e sobremesas lácteas.
- **Concentrado de soro com teor reduzido de lactose** – Produto especial, contendo menos de 1% de lactose. Emprega-se a enzima  $\beta$ -galactosidase no soro *in natura*, ocorrendo hidrólise da lactose em unidades menores (galactose + glicose). Em seguida, realizam-se os processos de separação por membranas como a ultrafiltração ou diafiltração para remoção desses açúcares. Este produto é utilizado na elaboração de queijos processados, molhos e carnes industrializadas, pois se deseja elevada concentração de proteína e redução do teor de lactose. Ainda é utilizado em casos de síndrome de intolerância à lactose.
- **Soro com teor reduzido de minerais** – Obtido pela remoção seletiva de parte dos minerais do soro por processo de troca iônica, eletrodialise ou por separação em membranas. Possui teor final de cinzas menor que 7% em base seca. É largamente

utilizado em fórmulas infantis, sobremesas congeladas, produtos de confeitaria e coberturas aeradas, não prejudicando o equilíbrio final de minerais nestes produtos. Os minerais removidos são posteriormente utilizados para fortificação de alimentos e bebidas.

- **Concentrado proteico de soro de leite (CPS)** – Obtido pela remoção de constituintes não-proteicos, com teor final de proteína de no mínimo 25%. É caracterizado pela larga faixa de variação entre 25 e 89% de teor proteico final. Contém pequenas quantidades de lactose, gordura e minerais. O mais disponível comercialmente possui 80% de proteína. Este produto é amplamente aplicado na indústria alimentícia pela funcionalidade que pode conferir aos alimentos. Também possui grande aplicação em nutrição esportiva e fortificação de alguns alimentos ajudando na formação e desenvolvimento de massa muscular.
- **Isolado proteico de soro de leite (IPS)** – Forma comercial mais pura das proteínas do soro. Contém entre 90 e 95% de proteína e praticamente isento de lactose e gordura. É obtido por processo de separação por membranas passando por operações de microfiltração (remoção da gordura), hidrólise da lactose e posterior ultrafiltração e dialfiltração. Sua principal aplicação ocorre em produtos lácteos, de panificação, de confeitaria, *snacks*, salgadinhos, aperitivos e carnes processadas devido às excelentes propriedades de gelificação, aeração, emulsificação retenção de água e gordura.
- **Proteína hidrolisada do soro** – Obtida através de hidrólise, formando segmentos menores, os peptídeos. Possuem maior digestibilidade e menor potencial alergênico que a proteína em seu estado nativo. Seu valor nutricional é mantido e é empregada, sobretudo, em fórmulas infantis e em produtos para praticantes de atividades físicas. Podem ser usadas em fórmulas enterais para pacientes em estado pós-cirúrgico, geriátricos e imobilizados ou na formulação de alimentos de baixa caloria e saudáveis, em substituição da gordura.

## 3.2 Hidrólise Proteica

### 3.2.1. Aspectos gerais

O processo de hidrólise proteica consiste na clivagem química ou enzimática de moléculas de proteínas em pequenos peptídeos de tamanhos diversos e, eventualmente, em aminoácidos (ADLER-NISSEN, 1986).

Para realização da hidrólise, diversos métodos são utilizados. A hidrólise química é mais comumente utilizada na prática industrial, porém os processos biológicos que utilizam adição de enzimas são mais promissores quando se deseja produtos com alta funcionalidade e valor nutritivo.

A hidrólise química é um processo que utiliza substâncias ácidas ou alcalinas para quebrar as ligações peptídicas das moléculas de proteínas e pode resultar na formação de compostos tóxicos e produtos com qualidade nutricional reduzida devido à destruição e/ou racemização de certos aminoácidos (GUADIX et al., 2000; BIASUTTI, 2006). Além disso, é

um processo de difícil controle (SGARBIERI, 1996), podendo levar à destruição de aminoácidos como lisina, treonina e triptofano (ADLER-NISSEN et al., 1986).

Já na hidrólise enzimática, as proteases hidrolisam ligações peptídicas específicas, promovendo a redução da massa molecular, mudanças conformacionais e aumento no número de grupos ionizáveis, assim como o aumento de exposição de grupos hidrofóbicos protegidos anteriormente pela estrutura globular, ocasionando mudanças no comportamento funcional da proteína (CARLOS, 1997). Este processo tem se destacado na melhoria das propriedades funcionais das proteínas, como solubilidade, capacidade emulsificante, textura, tendo grande aplicabilidade em vários produtos alimentícios (BIASUTTI, 2006).

As vantagens da hidrólise enzimática em relação aos métodos tradicionais são: seletividade, reduzindo a possibilidade do aparecimento de produtos de degradação; a utilização de condições moderadas de temperatura (40-60 °C) e pH (6-8); a manutenção do valor nutritivo, já que não ocorre degradação dos aminoácidos, ao contrário da hidrólise ácida, que destrói triptofano e desamina os aminoácidos serina e treonina, e da hidrólise alcalina que elimina arginina e cisteína (GUADIX et al., 2000). Também apresenta a possibilidade de realização em escala industrial, menor teor de sal no produto final e formação mínima de subprodutos (AFONSO, 2008).

No entanto, o processo enzimático de hidrólise apresenta algumas desvantagens como: custo elevado; utilização de enzimas comerciais não reutilizáveis; dificuldades de controlar a extensão da proteólise, principalmente em caso de mistura de proteases, podendo resultar produtos heterogêneos; baixa recuperação de proteína; dificuldades na inativação enzimática ao final do processo com ajustes no pH e uso de tratamento térmico, que podem afetar as propriedades do hidrolisado obtido (KRISTINSSON e RASCO, 2000a).

A hidrólise enzimática de polímeros em alimentos é um processo de considerável importância que tem sido utilizado para melhorar propriedades físicas, químicas e funcionais dos alimentos, sem prejudicar seu valor nutritivo, melhorando, particularmente, as características de absorção das proteínas (PACHECO et al., 2005).

Para que se obtenha hidrolisados com qualidade nutricional elevada e com propriedades desejáveis e agradáveis ao consumidor, é importante o controle das condições hidrolíticas, como pH, temperatura, enzima, tempo de hidrólise, tipo e concentração do substrato, relação enzima:substrato e inativação enzimática ao final do processo (SVENNING et al., 1993; CÂNDIDO, 1998).

O uso da hidrólise em soro de leite tinha como objetivo inicial aumentar a solubilidade das proteínas que sofriam desnaturação pela precipitação térmica; porém, foi verificado que as propriedades do material hidrolisado sofriam variação devido ao tipo e especificidade da enzima, grau de hidrólise, concentrações de enzima e proteína no substrato e condições de reação. Deste modo, observou-se que variando estes parâmetros poderiam ser obtidos hidrolisados com propriedades e aplicações diversas (CARLOS, 1997).

A hidrólise de proteínas possui diversas aplicações comerciais e é realizada com objetivo de melhorar propriedades funcionais das proteínas como solubilidade, formação de espuma, emulsificação e gelificação; propriedades nutricionais; sensoriais e de textura; assim como redução da alergenicidade de proteínas presentes nos alimentos (PARKIN, FENNEMA e DAMODARAN, 2010).

### 3.2.2 Proteases

As primeiras enzimas proteolíticas utilizadas pela indústria alimentícia foram as proteases pancreáticas de origem animal. Atualmente, as proteases de origem microbiana estão ganhando espaço e podem ser obtidas a partir de bactérias ou fungos. Para que sejam comercializadas, estas enzimas recebem a classificação de “grau alimentício”, ou seja, são inócuas, seguras para aplicação na indústria de alimentos (GUADIX et al., 2000).

Segundo Guadix et al. (2000), as proteases podem ser classificadas de acordo com:

- **Origem** – em animal, vegetal ou microbiana.
- **Ação catalítica** – em endopeptidases ou proteinases, atacando o interior das cadeias polipeptídicas; e em exopeptidases ou peptidases, atacando apenas os aminoácidos e peptídeos das extremidades da cadeia polipeptídica.
- **Natureza de seu sítio catalítico** – as endopeptidases são específicas para certos aminoácidos que se encontram no interior da cadeia polipeptídica, dependendo de cada enzima; as exopeptidases, por exemplo, são específicas para grupamentos amino e carboxi terminal.

As endopeptidases geralmente são empregadas quando se objetivam diminuições rápidas da massa molecular média de peptídeos, enquanto que as exopeptidases são destinadas à hidrólise de oligopeptídeos para transformá-los em aminoácidos (PARKIN, FENNEMA e DAMODARAN, 2010).

Segundo o modelo Linderstrom-Lang (Adler Nissen, 1986) a presença de diferenciados produtos de hidrólise permitem avaliar os mecanismos de reação de hidrólise para uma dada enzima. Assim, são descritos dois diferentes mecanismos, os quais consideram um equilíbrio entre as formas nativa e desnaturada do substrato, definidos pela taxa de produção tanto de intermediários como de produtos finais de hidrólise. O primeiro modelo, chamado *zipper*, propõe que as moléculas de proteínas são rapidamente hidrolisadas para polipeptídeos, em função da desestabilização da estrutura proteica que expõe as ligações peptídicas e que resultam em vários produtos intermediários. O segundo mecanismo, *one-by-one*, propõe que inicialmente, poucas moléculas são hidrolisadas uma a uma e o produto final da hidrólise consiste de proteínas intactas e de peptídeos de baixo peso molecular, não havendo detecção de produtos intermediários. Na maioria das proteínas existe um comportamento intermediário destes dois mecanismos de reação.

### 3.2.3 Hidrolisados proteicos

Os hidrolisados podem ser definidos como proteínas que são clivadas química ou enzimaticamente em peptídeos de vários tamanhos. Hidrolisados proteicos são produzidos para serem utilizados em ampla variedade de produtos alimentícios, incluindo substitutos de leite, suplementos protéicos, realçadores de sabor e estabilizadores em bebidas, dentre outros (MARTINS, COSTA e HERNÁNDEZ, 2009).

Segundo Parkin (2010), os fatores mais importantes na escolha de uma proteína que será fonte de um hidrolisado são: baixo custo, propriedades funcionais intrínsecas,

composição de aminoácidos, e se possível, a sequência primária desses aminoácidos. Todos estes fatores devem ser contextualizados com o tipo de enzima a ser utilizada, assim como temperatura e pH.

Teores de concentração da ordem de 8 a 10% são desejáveis nas fontes proteicas que originarão os hidrolisados. Para catalisar a reação de hidrólise, adiciona-se em torno de 2% de enzima com base no teor de proteína da matéria-prima. Existem diversos métodos capazes de monitorar o progresso dessa reação e o resultado deste monitoramento é denominado grau de hidrólise (GH) (PARKIN, FENNEMA e DAMODARAN, 2010).

De acordo com o grau de hidrólise alcançado, obtêm-se peptídeos de diferentes massas moleculares e responsáveis por inúmeras características funcionais. Dentre as faixas de peptídeos e sua funcionalidade temos a seguir (PARKIN, FENNEMA e DAMODARAN, 2010):

- **GH 3 - 6%** - Peptídeos de 2 a 5 kDa em média. Importantes na funcionalidade do hidrolisado.
- **GH 8%** - Peptídeos de 1 a 2 kDa em média. Com solubilidade ótima e indicado para uso em nutrição clínica e esportiva.
- **GH 50 - 70%** - Gera pequenos peptídeos e aminoácidos, menores que 1 kDa em média e utilizados em alimentos infantis, como hipoalergênicos e ingredientes saborizantes para sopas e molhos.
- **GH > 70%** - Acima deste valor observa-se acúmulo de peptídeos amargos devido ao reduzido tamanho e hidrofobicidade, sendo necessária a utilização de medidas que controlem estes efeitos.

A hidrólise é um processo que compreende um conjunto de etapas e, de acordo com a ação das proteases, temos como espécies intermediárias a formação de proteoses, peptonas, peptídeos e por fim, aminoácidos (Figura 3). Estas espécies diferem entre si basicamente pela massa molecular e solubilidade (GUADIX, et al. 2000).



**Figura 3** - Etapas de formação dos produtos na hidrólise enzimática

Ao final do processo de hidrólise, pode ocorrer a necessidade de um refino, um tratamento para separação dos peptídeos obtidos em diferentes pesos moleculares e consequentemente, destiná-los à adequada aplicação.

Numa busca em bancos de patentes, utilizando “whey protein hydrolysates” como palavras-chave foram encontrados 17 registros relativos ao soro de leite bovino segundo dados do European Patent Office (2013), os quais consistem em diversos produtos e processos

relacionados a esse substrato proteico. A maioria dos registros consiste em hidrolisados proteicos com diversas funções e atribuições, dentre as quais: prevenção da atrofia muscular com peptídeos menores que 10 kDa; peptídeos obtidos pela hidrólise com cardosina, enzima oriunda de espécie vegetal *Cynara*, utilizados como conservante natural de alimentos e responsáveis por fortalecer as defesas naturais do organismo; como supressor de processos inflamatórios; em formulações que atuam na redução da perda da função muscular; ação hipotensora; atividade antioxidante, antitumoral, protetora de danos ao DNA e utilizados em bebidas funcionais; fórmulas infantis e, ainda os hidrolisados foram descritos como adequados para uso farmacêutico.

### 3.3 Peptídeos Bioativos

Um crescente interesse vem surgindo nas últimas décadas pelo estudo das propriedades presentes nas proteínas oriundas do soro de leite. Atletas, praticantes de atividades físicas, pessoas fisicamente ativas e até mesmo portadores de doenças, vem procurando benefícios nessa fonte proteica. O soro desidratado possui de 12 a 14% de proteína com efeitos benéficos à saúde humana (CAMARGO, 2000).

Dentre as propriedades atribuídas às proteínas do soro encontram-se: imunomoduladora (imunoglobulinas); antimicrobiana (lactoferrina, lactoperoxidase,  $\alpha$ -lactoalbumina e imunoglobulinas); antiviral (lactoferrina); anticancerígena (concentrado de proteínas do soro; lactoferrina;  $\beta$ -lactoglobulina); antiúlcera (concentrado de proteínas do soro;  $\alpha$ -lactoalbumina) e proteção ao sistema cardiovascular (SGARBIERI, 2004).

A ação imunomoduladora vem sendo observada tanto em concentrados e isolados protéicos de soro de leite como em proteínas isoladas (imunoglobulinas, lactoferrina, lactoperoxidase, glicomacropéptido) obtidas do mesmo. A hidrólise enzimática confere às frações peptídicas oriundas das proteínas do soro atividade antimicrobiana e antiviral, pois libera peptídeos de diversos tamanhos moleculares e com sequências de aminoácidos com ação bactericida (SGARBIERI, 2004). Aos peptídeos oriundos do soro também é atribuída ação hipotensora, devido à inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA), agindo na prevenção/tratamento da hipertensão arterial (SINHA, 2007).

É importante salientar que os efeitos atribuídos às proteínas e peptídeos presentes no soro, dependem da preservação de sua integridade, demonstrando a necessidade de processos adequados de obtenção destes componentes, garantindo a manutenção de suas propriedades (SGARBIERI, 2004).

Peptídeos bioativos são definidos como fragmentos específicos de proteína que ocasionam impactos positivos em funções fisiológicas, influenciando positivamente na manutenção da saúde. Esses efeitos benéficos são atribuídos a inúmeras sequências de aminoácidos que podem exercer atividade antimicrobiana, antioxidante, antitrombótica, antihipertensiva e imunomodulatória (KORHONEN e PIHLANTO, 2006).

Segundo Gerdes, Harper e Miller (1999), o termo bioatividade se refere a componentes alimentares que podem afetar processos ou substratos biológicos e, por este motivo, podem ter um impacto sobre as funções corporais ou condições do organismo e, finalmente, sobre a saúde em geral.

Os peptídeos são amplamente classificados em cinco grupos: (i) peptídeos que formam estrutura em  $\alpha$  hélice; (ii) peptídeos ricos em resíduos de cisteína; (iii) peptídeos com estrutura em folha  $\beta$ ; (iv) peptídeos ricos em aminoácidos regulares como histidina, arginina e

prolina e, (v) peptídeos compostos por aminoácidos raros ou modificados (REDDY, YEDERY e ARANHA, 2004)

A forma de obtenção desses peptídeos é variada, podendo estes serem liberados da estrutura da proteína em seu estado nativo a partir da hidrólise enzimática limitada: (i) com uso de enzimas digestivas como tripsina e pepsina; (ii) por fermentação microbiana ou, (iii) através da proteólise com uso de enzimas de origem vegetal ou microbiana. Embora algumas proteínas em seu estado nativo apresentem propriedades bioativas, como a lisozima, presente no ovo, e a  $\alpha$  lactalbumina, oriunda do soro de leite, a hidrólise enzimática é o método mais comum na obtenção de peptídeos bioativos e a formação destes dependerá diretamente da especificidade hidrolítica da enzima utilizada (PIHLANTO-LEPPÄLÄ, 2001; AGYEI e DANQUAH, 2012).

A bioatividade dos peptídeos depende de suas características estruturais, de sua hidrofobicidade, de seu caráter básico e também da composição e sequência dos aminoácidos formadores da cadeia. O tamanho dessa cadeia pode variar entre 2 a 20 resíduos de aminoácidos. A maioria dos peptídeos aos quais é atribuída a ação antimicrobiana, por exemplo, são pequenos, hidrofóbicos e de natureza catiônica. Ainda, a presença de aminoácidos específicos na sequência do peptídeo pode fornecer propriedades peculiares ao mesmo. Um exemplo são os peptídeos conhecidos pela função de inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA), o qual contém ao menos um resíduo do aminoácido prolina em sua composição (KORHONEN e PIHLANTO, 2006; AGYEI e DANQUAH, 2012).

Diversas fontes podem ser precursoras de peptídeos bioativos como animal, vegetal ou microbiana (AGYEI e DANQUAH, 2012). Atualmente, as proteínas oriundas do leite são consideradas importante fonte de peptídeos bioativos, que vêm sendo obtidos a partir da hidrólise ou fermentação do leite (KORHONEN e PIHLANTO, 2006). A digestão ou degradação de proteínas do leite resulta na formação de peptídeos que possuem atividade biológica e que inicialmente encontravam-se em estado inativo, protegidos no interior da estrutura proteica. A estes são atribuídas funções como estimulação do sistema imunológico, propriedades antioxidantes, atividade anti-carcinogênica e controle da hipertensão arterial, despertando dessa forma o interesse da indústria em desenvolver alimentos que contenham estes componentes (WALZEM, 1999).

Assim, os peptídeos vêm sendo incorporados como ingredientes em alimentos funcionais e produtos nutracêuticos, onde sua atividade biológica pode ajudar no controle e prevenção de doenças. O potencial terapêutico atribuído aos alimentos funcionais e nutracêuticos se deve à presença de grupos funcionais específicos ou seus derivados, que são liberados durante a metabolização do alimento. As proteínas dietéticas, além da capacidade de fornecer aminoácidos e energia, também vêm sendo conhecidas por sua capacidade em fornecer benefícios à saúde, em sua forma intacta ou na forma de hidrolisados (AGYEI e DANQUAH, 2012).

A escassez de processos economicamente viáveis, que possam ser transferidos para escala industrial é atualmente um dos maiores entraves à larga distribuição de produtos elaborados com peptídeos bioativos no mercado consumidor. Alcançar rendimento satisfatório na obtenção de peptídeos bioativos requer a otimização de operações essenciais para sua separação e purificação sob condições economicamente viáveis. Ainda, para que estes sejam utilizados de forma segura como produto terapêutico, uma série de testes, *in vitro* e *in vivo*, precisam ser realizadas para afirmar com segurança seu modo de ação, dosagem ideal, forma de administração, toxicidade e efeitos causados no organismo (AGYEI e DANQUAH, 2012).

### 3.3.1 Atividade antioxidante

De forma geral, substância antioxidante é aquela que elimina ou inibe reações promovidas por oxigênio ou peróxidos. Essas substâncias podem ser naturais ou sintéticas e são adicionadas aos produtos para prevenir ou retardar reações oxidativas. Em bioquímica, são consideradas substâncias antioxidantes enzimas ou outras substâncias orgânicas capazes de neutralizar os efeitos prejudiciais da oxidação em tecidos animais. Em ciência de alimentos, antioxidantes tem um escopo mais amplo incluindo componentes que evitam a deterioração de alimentos e atuam também como um fator dietético, de forma a reduzir significativamente os efeitos adversos de espécies como oxigênio ou nitrogênio reativos formadas em processos fisiológicos do organismo humano (HUANG, OU, PRIOR, 2005).

As substâncias antioxidantes atuam de diversas formas e possuem diversos mecanismos de ação como: (i) eliminação de espécies reativas de oxigênio/nitrogênio, (ii) inibição da formação de espécies reativas, (iii) paralisação de reações em cadeia dos radicais livres, (iv) quelantes de íons metálicos, (v) inibidores de enzimas oxidativas e, (vi) como cofatores de enzimas antioxidantes, prevenindo de diversas formas contra o processo oxidativo (HUANG, OU, PRIOR, 2005).

Reações oxidativas em alimentos levam à deterioração e alterações de atributos como sabor, aroma, cor e textura, afetando sua qualidade. Os componentes alimentícios mais susceptíveis a estas reações são os lipídeos e as proteínas, através de interações com radicais livres presentes no alimento (ELIAS, KELLERBY e DECKER, 2008).

A estabilidade oxidativa dos alimentos está relacionada com o balanço de fatores antioxidantes e pró-oxidantes. Este balanço é mantido em sistemas biológicos *in vivo* através de enzimas, quelantes metálicos e agentes sequestrantes de radicais livres, que se encontram ativos e mantém esse balanço em favor do fator antioxidante, protegendo contra danos oxidativos. Porém, em alimentos, este sistema se encontra desorganizado e operações como moagem, mistura, homogeneização, remoção química ou física de fatores antioxidantes, aplicação de calor, exposição à luz, dentre outros, incrementam os fatores pró-oxidantes (ELIAS, KELLERBY e DECKER, 2008).

As estratégias utilizadas pela indústria alimentícia na prevenção de reações oxidativas são limitadas e encontram-se claramente reduzidas pela demanda atual por produtos naturais. Isto demonstra a necessidade de desenvolvimento de novas tecnologias neste âmbito, apontando a utilização de proteínas como ferramenta potencial para aumentar a estabilidade oxidativa dos alimentos, através de sua capacidade de interação com radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ERO). O fato das proteínas interagirem com radicais livres e ERO sugere que elas podem proteger os lipídeos contra oxidação se estas forem preferencialmente oxidadas em relação aos ácidos graxos insaturados (ELIAS, KELLERBY e DECKER, 2008).

A oxidação de proteínas resulta tipicamente na modificação do grupo R da cadeia lateral do aminoácido, embora a reação de polimerização ou fragmentação proteica possam ocorrer sob certas concentrações de oxigênio. Apesar de todos os aminoácidos sofrerem oxidação, os que apresentam maior susceptibilidade são os sulfurados (cisteína e metionina) e aqueles que possuem anel aromático nas cadeias laterais (triptofano, tirosina e fenilalanina). No caso de cisteína e metionina, isto ocorre pela retirada de hidrogênio do grupamento sulfidrílico (SH). Já para triptofano, tirosina e fenilalanina, a oxidação ocorre pelo ataque aos grupamentos hidroxila (OH) ou oxidação de um elétron do anel aromático. Também causa oxidação a exposição a oxigênio singlete e a compostos clorados. Os resíduos de aminoácidos alifáticos são menos reativos (ELIAS, KELLERBY e DECKER, 2008).

A maioria dos produtos da oxidação de aminoácidos contém derivados carbonílicos que podem ser facilmente mensurados por métodos espectrofotométricos (REQUENA et al., 2003 apud ELIAS, KELLERBY e DECKER, 2008).

A presença de atividade antioxidante em proteínas se deve à presença de alguns aminoácidos de estrutura primária e dependem de sua sequência na formação da estrutura proteica (ARCAN e YEMENICIOGLU, 2007). A estrutura conformacional da proteína influencia diretamente na transferência de radicais livres entre os resíduos de aminoácidos que a compõe, de forma que, quanto mais flexível a estrutura da proteína, maior é a transferência (ELIAS, KELLERBY e DECKER, 2008).

Essa atividade ocorre por mecanismos específicos dentre os quais: a capacidade dos resíduos de aminoácidos em doar prótons aos radicais livres (triptofano, fenilalanina, tirosina, histidina, cisteína); por sua capacidade de quelar cátions metálicos (ácido glutâmico, ácido aspártico, lisina, arginina, histidina); redução de hidroperóxidos; eliminação enzimática de oxidantes específicos e alteração de propriedades físico-químicas de sistemas alimentícios de forma que dificulte o contato entre espécies reativas (ELIAS, MCCLEMENTS e DECKER, 2005).

Das proteínas do soro, observa-se alta capacidade antioxidante principalmente da fração  $\alpha$ -lactalbumina (SALAMI et al., 2010). Estudos sugerem que proteínas como a lactoferrina e albumina do soro bovino são capazes de formar complexos com metais como o ferro e cobre, respectivamente (SYMONS e GUTTERIDGE, 1998). Em avaliação realizada com resíduos de aminoácidos provenientes de  $\beta$ -lactoglobulina, foi demonstrada a capacidade de manter a estabilidade oxidativa de lipídeos devido à oxidação preferencial de triptofano e cisteína antes dos ácidos graxos insaturados, presentes numa emulsão água em óleo (ELIAS, KELLERBY e DECKER, 2008).

Hidrolisados protéicos possuem maior habilidade de reduzir a reatividade de radicais livres devido à exposição de aminoácidos que reagem mais efetivamente com esses radicais, reduzindo assim sua capacidade de oxidar lipídeos. A capacidade antioxidante de proteínas pode ser aumentada também por interações com açúcares redutores através de produtos da reação de Maillard (ELIAS, KELLERBY e DECKER, 2008).

De acordo com Sarmadi e Ismail (2010), o mecanismo de atividade antioxidante de um peptídeo está relacionado à sua composição em aminoácidos assim como a sequência destes na formação do peptídeo. No Quadro 2, verifica-se o mecanismo antioxidante de acordo com a natureza do aminoácido:

**Quadro 2** - Composição em aminoácidos e sua relação com atividade antioxidante

<b>Natureza do aminoácido</b>	<b>Mecanismo de ação</b>
<b>Aminoácidos aromáticos</b>	Convertem radicais livres em moléculas estáveis através da doação de elétron enquanto mantém a própria estabilidade via estrutura de ressonância.
<b>Aminoácidos hidrofóbicos</b>	Aumentam a solubilidade do peptídeo em frações lipídicas, facilitando o acesso deste a espécies hidrofóbicas de radicais livres.
<b>Aminoácidos ácidos e básicos</b>	Grupamentos carboxi e amino terminal nas extremidades da cadeia atuam como quelante de íons metálicos ou como doadores de hidrogênio.
<b>Cisteína</b>	Grupamento sulfidrilato atua como sequestrante de radicais livres e auxilia na ação de enzimas antioxidantes como a glutatona peroxidase.

**Fonte:** Sarmadi e Ismail (2010)

Os métodos mais comumente utilizados para medir a atividade antioxidante são baseados na geração de radicais livres e a presença de compostos antioxidantes contidos na amostra que sequestram esses radicais. Neste trabalho a avaliação da atividade antioxidante *in vitro* dos peptídeos foi determinada pelos métodos ABTS e ORAC por possuírem diferentes mecanismos de reação, o qual o método ORAC é baseado na transferência de átomos de hidrogênio e o método ABTS baseado na transferência de elétrons (SARMADI, ISMAIL, 2010).

O método ABTS (ácido 2,2 azino-bis (3-etilbenzotiazolina-ácido 6-sulfônico) baseia-se no comportamento espectral deste radical que absorve luz a 734 nm somente na forma de cátion (ABTS<sup>+</sup>). A partir de uma curva padrão de Trolox (ácido 6-hidroxi-2-5-7-8-tetrametilcromo2-carboxílico), análogo sintético da vitamina E, correlaciona-se o decréscimo da absorvância da solução de ABTS<sup>+</sup> em presença da amostra com a concentração de compostos com atividade antioxidante.

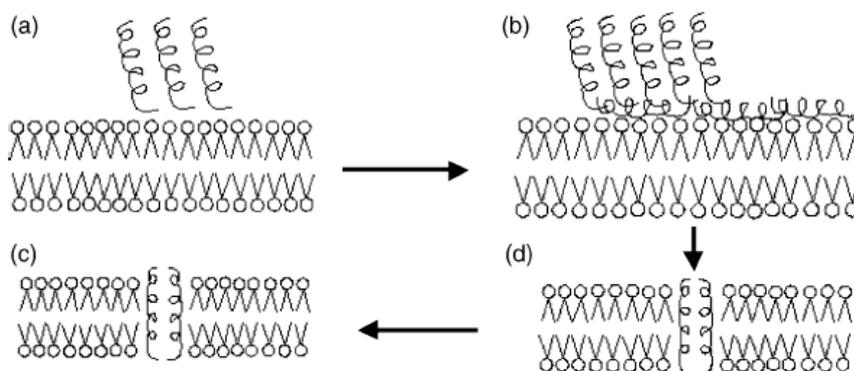
O método ORAC (*Oxygen radical antioxidant capacity*) consiste em medir o decaimento na fluorescência de uma proteína alvo, sendo este resultante da perda de sua conformação quando sofre danos oxidativos causados por uma fonte de radicais peroxil (ROO•). Assim, deve-se medir a capacidade da substância antioxidante presente na amostra analisada em proteger a proteína alvo contra os danos oxidativos. A proteína alvo comumente utilizada é a fluoresceína (30, 60- dihidroxispiro [isobenzofuran-1 [3H], 90 [9H] – xanten]-3-ona) e o AAPH (Dicloridrato de 2,2-Azobis(2-metilpropionamida) como fonte de radicais peroxil (ZULUETA, ESTEVE e FRÍGOLA, 2009).

### 3.3.2 Atividade antimicrobiana

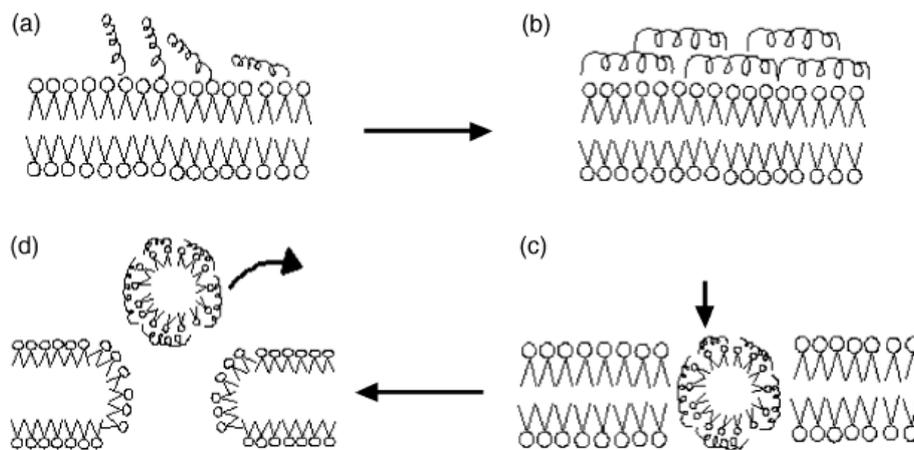
Atualmente, observa-se um aumento na procura de alimentos naturais pelo mercado consumidor. A indústria de alimentos tem passado por constantes pressões para que sejam removidos os conservantes químicos e que adotem alternativas naturais para a preservação da estabilidade e aumento da vida de prateleira de seus produtos. Para atender esta demanda, pesquisas são realizadas com objetivo de extrair, isolar e identificar substâncias químicas de origem vegetal ou animal, assim como desenvolver produtos biotecnológicos com potencial de aproveitamento pelas indústrias. Dentre essas substâncias naturais, as proteínas e peptídeos se destacam por serem comumente encontrados na natureza e pertencerem ao sistema imune inato de qualquer organismo vivo (RUAS, 2010).

Acredita-se que a maioria dos peptídeos age pela ruptura da membrana plasmática, levando à lise da célula microbiana. No caso dos microrganismos, os lipídeos aniônicos estão expostos em abundância na superfície da membrana e a natureza catiônica de certos peptídeos permite uma ligação efetiva destes à membrana celular, levando assim a um aumento de sua permeabilidade (REDY, YEDERY, ARANHA, 2004). Inicialmente, ocorre uma atração eletrostática entre as moléculas de peptídeos, que geralmente possuem carga positiva, e os lipídeos aniônicos presentes na membrana. Posteriormente, a estrutura anfipática dos peptídeos antimicrobianos age, promovendo a interação dos peptídeos antimicrobianos com a interface hidrofílica/hidrofóbica da bicamada fosfolipídica presente na superfície dessas membranas (MAGET-DIANA, 1999; NAGHMOUCHI et al, 2007).

Dois esquemas desse processo são ilustrados nas Figuras 4 e 5 (REDY, YEDERY, ARANHA, 2004).



**Figura 4** – Processo de formação de poros na membrana celular microbiana modelo chamado de “barril” (a) aproximação de diversos peptídeos na superfície da membrana celular; (b) em seguida, inúmeros peptídeos se depositam na superfície; (c) as hélices dos peptídeos são inseridas na porção hidrofóbica da membrana com a adição de mais peptídeos há um crescimento do tamanho do poro formado, o que causa extravasamento de conteúdo citoplasmático; (d) morte celular



**Figura 5** – Processo de ruptura da membrana celular microbiana modelo chamado de “tapete”. De acordo com o modelo, os peptídeos estão em contato preferencial com a porção hidrofílica da bicamada lipídica da membrana durante todo o processo (a) aproximação dos peptídeos na superfície da membrana; (b) alinhamento dos monômeros de peptídeos na superfície da membrana, de modo que os resíduos hidrofílicos fiquem em contato com a extremidade hidrofílica da bicamada; (c) os peptídeos se reorientam em direção à porção hidrofóbica; (d) ruptura da membrana e desintegração da conformação de bicamada fosfolipídica.

De acordo com Salami et al. (2010), concentrados proteicos de soro de leite bovino e concentrado proteico de soro de leite oriundo de camelídeos apresentaram significativa atividade antimicrobiana. Verificou-se, no entanto, que este desempenho foi realçado quando estes concentrados proteicos foram submetidos à hidrólise enzimática. Ainda de acordo com os autores, para adequada atividade antimicrobiana é necessário que na cadeia polipeptídica haja uma sequência de aminoácidos entre 2 e 20 resíduos. Os autores sugerem que os peptídeos de tamanhos menores apresentam maior efetividade na atividade antimicrobiana, pois possuem maior facilidade em se ligar aos lipídeos presentes na membrana celular das bactérias.

Segundo Sgarbieri (2004), foi atribuída atividade antimicrobiana às frações proteicas do soro de leite bovino: à lactoferrina, por ligar-se ao ferro e indisponibilizar este mineral para os microrganismos; à lactoperoxidase, por oxidar tiocianatos em presença de peróxido de hidrogênio, atuando assim como bactericida; à  $\alpha$ -lactalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina, por exercer atividade antimicrobiana após submetidas ao processo de hidrólise enzimática; e também às imunoglobulinas do soro de leite.

### 3.4 Processos de Separação por Membranas (PSM)

#### 3.4.1. Aspectos gerais

Os PSM são operações que permitem concentrar, fracionar ou purificar diversos produtos presentes em misturas, suspensões e soluções (ORDÓÑEZ, 2005). Os PSM vêm sendo utilizados em diferentes setores, que vão desde a indústria química, passando pela

alimentícia, farmacêutica e também pelas áreas médica, biotecnológica e para o tratamento de água (HABERT, BORGES e NÓBREGA, 2006).

Um setor onde esta tecnologia está largamente difundida é o de laticínios, onde é utilizada na concentração de proteínas do soro lácteo, para concentrar leite utilizado na elaboração de queijos, na eliminação seletiva de sais e lactose e na remoção de microrganismos e células somáticas do leite (SANTOS et al., 2006; ORDOÑÉZ, 2005).

### **3.4.2 Caracterização das membranas**

A membrana é definida como uma barreira seletiva que separa o material processado em duas fases (alimentação e permeado), restringindo, total ou parcialmente, o transporte de uma ou várias espécies químicas presentes nestas fases através da membrana. Elas podem, ainda, apresentar inúmeras características, podendo ser naturais ou sintéticas, neutras ou carregadas, espessas ou finas, de estrutura homogênea ou heterogênea, com mecanismo de transporte ativo ou passivo, entre outras (MULDER, 1991).

De um modo geral, as membranas, são classificadas em duas grandes categorias: densas e porosas. Na membrana porosa, o transporte é realizado devido à diferença de tamanho entre a partícula, ou molécula que compõe a fase da alimentação e os poros da membrana. Já na membrana densa, a ausência de poros faz com que o transporte de componentes envolva propriedades de sorção e difusão da espécie através do material que constitui a membrana (HABERT, BORGES e NÓBREGA, 2006).

Em operações onde são utilizadas membranas porosas como microfiltração (MF), ultrafiltração (UF), nanofiltração (NF) e diálise (D), a seletividade da membrana está intimamente associada à relação entre o tamanho das espécies químicas presentes e o tamanho dos poros da membrana. Nas três primeiras operações, nas quais a força motriz é o gradiente de pressão, o transporte se dá por convecção e na diálise, cuja força motriz é o gradiente de concentração, o transporte se dá por difusão (HABERT, BORGES e NÓBREGA, 2006).

As membranas sintéticas comerciais são produzidas a partir de material orgânico, em sua maioria polímeros (acetato de celulose, polisulfona, poliétersulfona, poliacrilonitrila, poliéterimida e policarbonato), e material inorgânico como metais, cerâmicas e óxidos metálicos. Estes últimos apresentam maior vida útil e eficiência na limpeza, porém, são de custo mais elevado em relação aos polímeros (HABERT, BORGES e NÓBREGA, 2006).

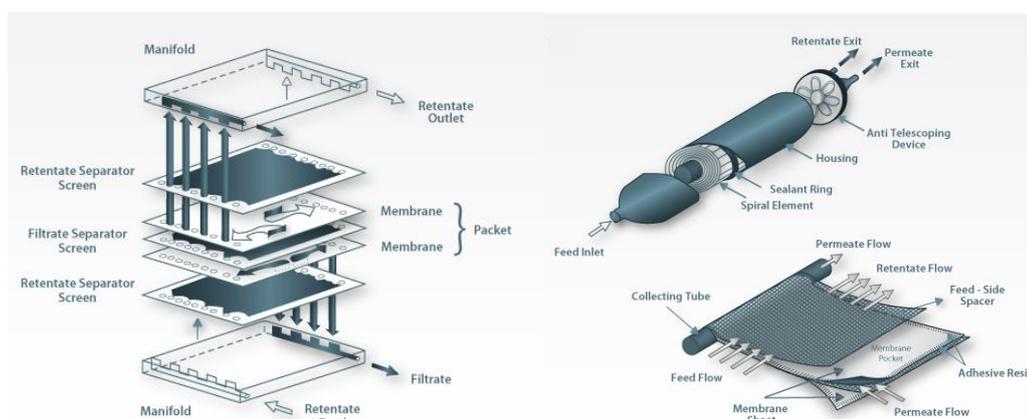
Os materiais com os quais são confeccionadas as membranas são diversos e devem suportar altas pressões, amplas variações de pH e temperatura além das operações de limpeza e desinfecção a que são submetidos na indústria (GAVA, SILVA e FRIAS, 2008).

A caracterização das membranas é fator primordial para que se determine sua adequada aplicação. Neste sentido, é importante relacionar características como porosidade, distribuição de tamanho de poros, em membranas porosas, pois estes irão determinar quais moléculas ou partículas serão retidas ou atravessarão a membrana. Também é importante a observância de parâmetros relacionados com permeabilidade e seletividade, como curva de retenção e o fluxo de permeado. Já para membranas densas, características como cristalinidade, volume livre e espessura são importantes devido à natureza do transporte (sorção e difusão), onde afinidade da espécie química pelo material que compõe a membrana é fundamental.

As menores unidades responsáveis pelo arranjo de membranas são os módulos, e estes foram projetados para acondicionar e otimizar o processo de escoamento da solução de alimentação e permeado através da membrana. A escolha do tipo mais adequado dependerá de

uma série de fatores, dentre os quais: elevada relação entre a área de membrana e o volume do módulo (densidade de “empacotamento”), controle do escoamento, facilidade de limpeza e baixo custo de fabricação. Os módulos são classificados quanto sua geometria sendo estas: (a) geometria plana, constituída de módulo em espiral e módulo em placas; (b) geometria cilíndrica dividida em tubular, capilares e fibras-ocas (HABERT , BORGES e NÓBREGA, 2006).

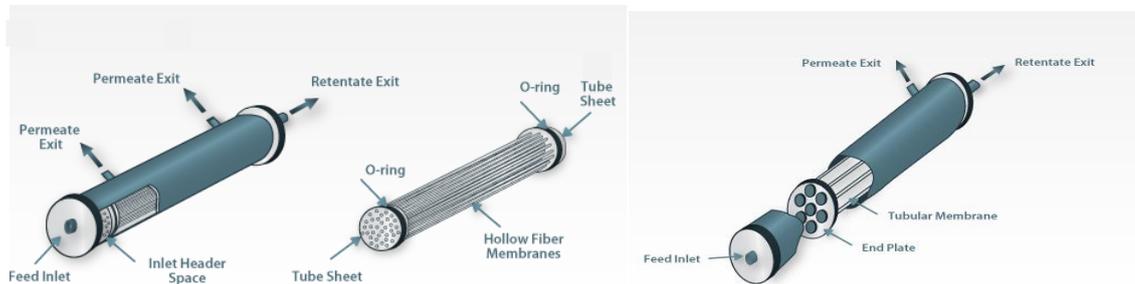
**(a) Geometria Plana - Módulo placa-quadro e módulo em espiral** (Figura 6) - O primeiro é similar à configuração de um filtro-prensa. As membranas encontram-se dispostas de forma paralela, intercaladas por espaçadores e suportes. A alimentação ocorre simultaneamente a todas as membranas e a solução concentrado é recolhida por um duto central. São utilizados em aplicações de média e pequena escala, área de empacotamento baixa ( $400 - 600 \text{ m}^2/\text{m}^3$ ), custo de fabricação elevado. Apresentam fácil controle das condições de escoamento da alimentação e permeado, as membranas danificadas podem ser facilmente repostas sem a perda do módulo. No segundo a membrana encontra-se entre dois espaçadores, um é o coletor para o permeado e outro fornece espaço para escoar a solução de alimentação e está configurado de forma “enrolada”. O permeado esco radialmente e a alimentação paralelamente ao duto central. Possui área de empacotamento elevada ( $800 - 1000 \text{ m}^2/\text{m}^3$ ), custo de fabricação baixo, entretanto, o escoamento de permeado é inferior ao módulo placa-quadro.



**Figura 6** – Geometria plana – (i) módulo placa-quadro e (ii) módulo em espiral(Fonte: Portal laboratórios virtuais de processos químicos, 2007)

**(b) Geometria cilíndrica - módulo fibra-oca e capilar e módulo tubular** (Figura 7) – No primeiro, as membranas assumem a forma de capilares ou fibras com diâmetro externo entre 0,5 a 3 mm e 5 mm respectivamente. A principal característica deste módulo é a ausência do suporte, o que torna seu custo de fabricação mais competitivo, área de empacotamento elevada ( $800 - 1200 \text{ m}^2/\text{m}^3$ ) para capilares e ( $10.000 \text{ m}^2/\text{m}^3$ ) para fibras-ocas. As condições de escoamento são fortemente afetadas pelo diâmetro das membranas, ou seja, quanto menor pior é o controle. No segundo a membrana está em contato com um suporte constituído de um tubo poroso. O número de tubos em cada módulo varia e são ligados e série. Possui baixa área de empacotamento ( $20 - 30 \text{ m}^2/\text{m}^3$ ), custo de fabricação elevado, no entanto, apresenta condições de escoamento

muito bem controladas e seu uso se justifica quando a solução de alimentação contém muito material particulado em suspensão.



**Figura 7** – Geometria cilíndrica – (i) módulo fibra-oca e (ii) módulo tubular

(Fonte: Portal laboratórios virtuais de processos químicos, 2007)

### 3.4.3 Princípios do PSM

A eficiência de uma membrana depende de dois parâmetros: o fluxo permeado através da membrana e a seletividade. O primeiro é definido como volume ou massa que atravessa a membrana por unidade tempo através de uma determinada área de membrana. A capacidade seletiva de uma membrana em relação a uma dada espécie é medida através de parâmetros diferentes em função da força motriz aplicada (MULDER, 1991).

#### 3.4.3.1 Fluxo de permeado

De um modo geral, em processos que utilizam pressão como força motriz, o fluxo permeado de solvente puro é diretamente proporcional ao gradiente de pressão. Dessa forma, admitindo que a membrana seja inerte em relação ao solvente e não apresente deformação pela ação da pressão (compactação), o fluxo de permeado apresentará uma dependência linear com a pressão. Para uma mesma pressão de operação, observa-se que o fluxo de permeado diminui com o aumento da viscosidade do fluido, ou seja, a permeabilidade da membrana é inversamente proporcional à viscosidade do meio fluido (HABERT, BORGES e NÓBREGA, 2006).

O fluxo também depende da estabilidade mecânica da membrana, pureza do solvente e sua baixa interação com os componentes da membrana. Para membranas porosas, o fluxo de permeado tem natureza fundamentalmente convectiva, enquanto para membranas densas, este é sempre de natureza difusiva (HABERT, BORGES e NÓBREGA, 2006).

O fluxo de permeado ( $J$ ) é determinado utilizando a equação 1 a seguir (GIRARD e FUKUMOTO, 2000).

$$J = \frac{V}{t \times A} \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde:

**V:** volume coletado de permeado num determinado tempo

**t:** tempo durante o qual a amostra foi coletada

**A:** área de filtração da membrana

Ao final do processo, um parâmetro muito importante a ser avaliado é o fator de concentração volumétrica (FCV), em função do tempo, que é determinado pela razão entre a massa inicial na alimentação e a massa final de retido (volume da alimentação subtraído do volume de permeado), utilizando a equação 2 (GIRARD e FUKUMOTO, 2000).

$$FCV = \frac{V_a}{(V_a - V_p)} \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde:

**V<sub>a</sub>:** volume inicial da alimentação

**V<sub>p</sub>:** volume de permeado

### 3.4.3.2 Seletividade

A membrana é uma barreira que separa duas fases e que restringe total ou parcialmente o transporte de uma ou várias espécies químicas presentes nas fases.

Para processos que utilizam membranas porosas (MF, UF e NF), a capacidade seletiva está diretamente associada à relação entre o tamanho dos poros da membrana e o tamanho das espécies presentes (que devem ser praticamente inertes ao material que compõe a membrana). Para processos cuja força motriz é o gradiente de pressão, a medida da seletividade é dada pelo *coeficiente de rejeição* (R), que varia entre 0 a 1 e é definido por uma relação entre a concentração de uma espécie na alimentação (C<sub>a</sub>) e sua concentração no permeado (C<sub>p</sub>) (HABERT, BORGES e NÓBREGA, 2006).

Este coeficiente de rejeição pode ser calculado conforme equação 3 (GIRARD e FUKUMOTO, 2000).

$$R = 1 - \left( \frac{C_p}{C_a} \right) \times 100 \quad (\text{Eq. 3})$$

Onde:

**C<sub>p</sub>:** concentração no permeado,

**C<sub>a</sub>:** concentração na alimentação.

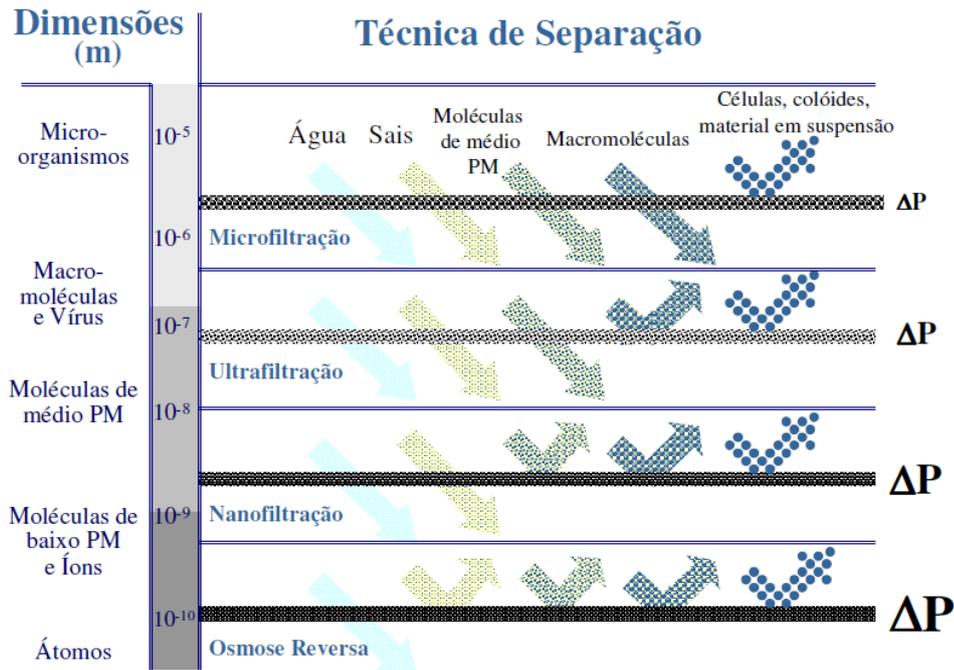
Assim, quando  $R=0$ , a concentração da espécie em questão é igual tanto no permeado quanto na alimentação, ou seja, a membrana não possui capacidade seletiva para este componente. Já quando  $R=1$ , significa que a espécie em questão não está presente no permeado, ou seja, a membrana foi capaz de rejeitá-la completamente (HABERT, et al, 2006).

### 3.4.4 Operações utilizando membranas porosas

Os PSM, nos quais a força motriz empregada é o gradiente de pressão, aproximam-se bastante da filtração clássica. Assim operações como microfiltração (MF), ultrafiltração (UF), nanofiltração (NF) e osmose inversa (OI) apresentam meio filtrante (membrana) com redução gradual do tamanho do poro (Figura 8). Admite-se inclusive a ausência destes em membranas de OI.

- **Microfiltração** - Esta operação é, dentre aquelas que utilizam pressão como força motriz, a mais próxima da filtração clássica. Estas membranas possuem poros com tamanho entre 0,1 e 10  $\mu\text{m}$ , consideradas relativamente “abertas”, requerendo assim o emprego de pressões inferiores a 3 bar no processamento. É um processo indicado para retenção de materiais em suspensão ou emulsão.
- **Ultrafiltração** – As membranas de UF apresentam poros com tamanho entre 1 e 100 nm, mais “fechadas” que as membranas de MF, sendo capazes de reter macromoléculas da ordem de 10 a  $10^3$  KDa. O gradiente de pressão utilizado é maior, numa faixa de 2 a 10 bar, devido a diminuição do tamanho dos poros em relação a MF, permitindo fluxos de permeado elevados. Os fluxos obtidos com UF estão na faixa de 150 a 250  $\text{L/h.m}^2$ . A ultrafiltração é largamente utilizada na concentração de soluções contendo proteínas.
- **Nanofiltração** – Processo que efetua separação de moléculas de massa molar média (500 Da a 2 KDa).

Observa-se ainda como um processo auxiliar a operação de diafiltração. Esta é utilizada em associação com outra operação (UF, por exemplo) quando objetiva-se purificar determinado soluto presente em uma solução cujos contaminantes são compostos de dimensões menores ao qual se deseja obter. De forma simplificada, podemos considerar como um processo de lavagem da solução. Assim, os contaminantes vão sendo eliminados no permeado através da alimentação contínua de solvente e retenção pela membrana, apenas do soluto de interesse.



**Figura 8** - PSM que utilizam gradiente de pressão como força motriz

(Fonte: DEBON, 2009)

### 3.4.5 Vantagens da utilização de PSM

Dentre as vantagens desta tecnologia podem ser citadas: economia de energia, pois realiza a separação sem que haja mudança de fase do produto de interesse; alta seletividade; eficiência na separação de compostos termosensíveis; e simplicidade de operação e escalonamento, já que a operação dos equipamentos é bastante simples e não necessita de intensiva mão-de-obra (HABERT, BORGES e NÓBREGA, 2006).

Os principais problemas a que estão susceptíveis as membranas são a deformação mecânica, como a compactação, em decorrência da pressão aplicada e das características estruturais da membrana; inchamento da matriz polimérica devido a interações físico-químicas com o solvente; polarização ou deposição de soluto na superfície da membrana e a incrustação (*fouling*) pelo entupimento dos poros. Tudo isso acarreta na diminuição do fluxo de permeado.

Com o advento do fluxo tangencial (*cross flow*), onde a alimentação ocorre de forma paralela à membrana e o permeado é transportado transversalmente à mesma, houve redução de parte deste problema da diminuição do fluxo. O sistema de fluxo convencional (*dead end*), onde o fluido escoava de maneira perpendicular à superfície da membrana, favorece o acúmulo de componentes do líquido nesta superfície e, conseqüentemente, o fenômeno da polarização por concentração (HABERT, BORGES e NÓBREGA, 2006).

Também são realizadas operações como retrolavagem (*backflushing*) que inverte, por curto intervalo de tempo, o sentido do fluxo de permeado e variação da pressão através da membrana para evitar queda no fluxo de permeado. Além dessas operações, é muito

importante a realização de limpezas periódicas das membranas com soluções ácidas ou alcalinas (HABERT, BORGES e NÓBREGA, 2006).

### 3.4.6 Aplicação de PSM na indústria

O uso de PSM em escala comercial torna-se cada vez mais expressivo frente às vantagens oferecidas por essa tecnologia. Por ser um processo de separação/fracionamento/concentração que utiliza temperaturas mais baixas durante processamento, com menor consumo de energia e utilização de instalações compactas e de fácil operação, propicia uma alternativa mais econômica em comparação com outros métodos convencionais tais como filtração a vácuo ou filtros-prensas.

Esta tecnologia permite uma alta recuperação de compostos de aroma e sabor em sucos, preservação das características nutricionais de compostos, redução da atividade de água, melhora na conservação e aumento de vida de prateleira de bebidas e economia no transporte e armazenamento, concentrando componentes de interesse (JESUS et al., 2007). Também é uma tecnologia bastante difundida na clarificação de sucos, reduzindo sua adstringência, reduzindo assim o uso de conservadores químicos sem alterar as características sensoriais e nutricionais (CIANCI et al., 2005; MATTA, MORETTI e CABRAL, 2004).

O uso de PSM aplicado à indústria de óleos permite a suplementação ou complementação de processos de refino. Isto proporciona melhor recuperação de solventes uma vez que a membrana possui boa estabilidade química frente a diversos solventes como, por exemplo, o hexano. Ainda reduz perdas de óleo na etapa de neutralização, reduz a quantidade de terra clarificante requerida na etapa de branqueamento, pela remoção prévia de pigmentos como carotenóides e clorofilas. Também é verificada a concentração de compostos de interesse como os tocoferóis, composto antioxidante presente em óleos vegetais (RIBEIRO et al., 2005).

Além do uso industrial como uma etapa na obtenção de produtos de maior qualidade, os PSM também são utilizados no tratamento de água. Os tratamentos convencionais como filtração e uso de carvão ativo produzem água isenta de microrganismos e de aparência cristalina, porém não isenta de sais. Os PSM permitem obtenção de água com elevado grau de pureza que é utilizada em indústria farmacêutica, nuclear e permite a dessalinização de água do mar através do processo de osmose inversa (BRESCIANI et al., 2009).

Segundo Lima, Santana e Souza (2009), os PSM são uma alternativa economicamente atraente para recuperação e purificação de proteínas, como por exemplo, enzimas de interesse alimentício e farmacêutico de origem vegetal, animal ou microbiana.

Outro setor onde a tecnologia de PSM está amplamente difundida é na indústria de laticínios. Segundo Pouliot (2008), na década de 70 iniciou-se a utilização de materiais de maior resistência química na elaboração de membranas e criação de módulos com maior facilidade de limpeza, permitindo assim o uso na indústria de produtos lácteos.

De acordo com Pouliot (2008), a aplicação de PSM na indústria de laticínios se dá por três diferentes motivos: (i) como uma alternativa às operações unitárias tradicionais como centrifugação (desnate), evaporação (remoção de água), aplicação de calor (inativação de microrganismos) e eletrodialise (desmineralização do soro); (ii) resolvendo problemas de separação como: remoção de gordura de soro de leite, remoção das micelas de caseína do leite e de esporos bacterianos de leite desnatado e soro de leite; extração e separação de proteínas e peptídeos do soro de leite; e reciclagem de soluções de limpeza e salmouras; (iii) na criação de novos produtos como queijos ultrafiltrados, bebidas lácteas (permeado da UF), leites

fermentados, produtos lácteos com textura diversificada e leite com maior vida de prateleira (*extended shelf life*).

Segundo Saboya e Maubois (2000), o pré-tratamento do leite por MF permite um tratamento térmico mais brando, o que mantém o sabor e aumenta a vida de prateleira em aproximadamente 3 a 5 vezes mais quando comparado aos produtos obtidos por métodos clássicos. O queijo elaborado com leite cru, processado previamente por MF, apresenta segurança microbiológica igual ou superior ao queijo feito com leite submetido à pasteurização.

Ainda de acordo com os mesmos autores, a MF pode ser utilizada para remoção de gordura residual de soro de leite, na clarificação e remoção de microrganismos presentes na salmoura de queijo e na separação das micelas de caseína dos glóbulos de gordura. Dessa forma, a indústria pode obter maiores rendimentos e diversificação dos produtos lácteos, com maior vida de prateleira e melhor qualidade.

Os processos de MF e UF para a concentração de proteínas do soro de leite apresentam características operacionais como a diminuição no fluxo de permeado através da membrana ao longo do processo. Há uma queda inicial de fluxo, devido à camada de polarização formada pela deposição de solutos na superfície da membrana, seguida de uma estabilização, mantendo fluxo em estado quase constante. No entanto, o fluxo continua a diminuir lentamente com a operação contínua do sistema, após várias horas de funcionamento. O fluxo final pode ser significativamente menor do que este valor de estado quase constante. Além disso a obstrução e adsorção de proteínas nos poros da membrana também são fatores responsáveis pela queda do fluxo (CARIC 2000; CASTRO e GERLA, 2005).

Para evitar ou minimizar esses efeitos a etapa de limpeza é de extrema importância, fazendo parte do processo operacional e mantendo a performance satisfatória do sistema de membranas. O ciclo de limpeza ideal utilizado na indústria láctea inclui uso de solução ácida, seguida de solução alcalina circulando através do sistema (D' SOUZA e MAWSON, 2005).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Materiais

#### 4.1.1 Matéria-prima

Foi utilizado um concentrado proteico de soro de leite bovino, em pó, com 34 % de proteína, gentilmente fornecido pela Alibra® Ingredientes localizada na cidade de Campinas - SP.

#### 4.1.2 Membranas

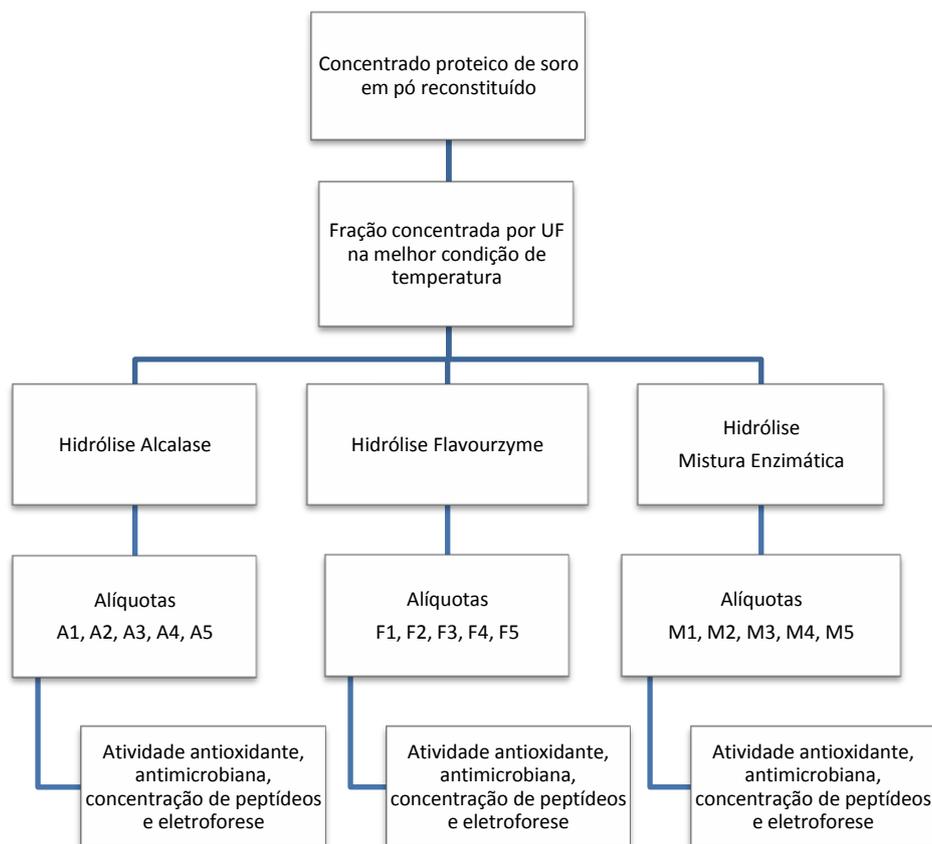
No processo de UF utilizou-se um sistema constituído por quatro módulos tubulares de membranas cerâmicas (TIA, Techniques Industrielles Appliquées, Bollene, França), com massa molecular de corte entre 10 e 20 kDa, área de permeação total de 0,022 m<sup>2</sup> e vazão de recirculação de 900 L/h. Todos os PSM foram realizados na planta piloto, da Embrapa Agroindústria de Alimentos (Guaratiba – Rio de Janeiro).

#### 4.1.3 Enzimas

Para o processo de hidrólise foram utilizadas as enzimas comerciais (Novozymes, Bagsvaerd, Dinamarca) Alcalase® 2.4 L FG, uma endopeptidase de origem microbiana produzida a partir de *Bacillus licheniformes* e Flavourzyme® 1000 L, uma exopeptidase também de origem microbiana produzida a partir de *Aspergillus oryzae*, ambas gentilmente cedidas pela empresa Tovani- Benzaquen Ingredientes.

### 4.2. Métodos

Para uma melhor visualização das etapas do presente trabalho é apresentado a seguir um diagrama esquemático simplificado (Figura 9).



**Figura 9** - Fluxograma das etapas realizadas no presente trabalho iniciando com a reconstituição do concentrado proteico do soro em pó, seguida do processo de ultrafiltração. Com a fração concentrada por UF realizou-se a hidrólise com as diferentes enzimas obtendo diferentes alíquotas submetidas à análise de atividade antioxidante e antimicrobiana e à eletroforese Tricina SDS – PAGE para avaliar a formação de peptídeos.

## 4.2.1 Processos

### 4.2.1.1 Concentração das proteínas do soro

Inicialmente o concentrado proteico de soro em pó foi reconstituído em água destilada na mesma proporção proteica encontrada no soro *in natura* descrita na literatura, que é cerca de 0,8 % em base úmida (ANTUNES, 2003). Em seguida a amostra foi aquecida até atingir a temperatura de processamento avaliada, sendo então transferida para o tanque de alimentação do sistema de membranas. Para a fase de testes, o volume total preparado foi de 2L de soro reconstituído.

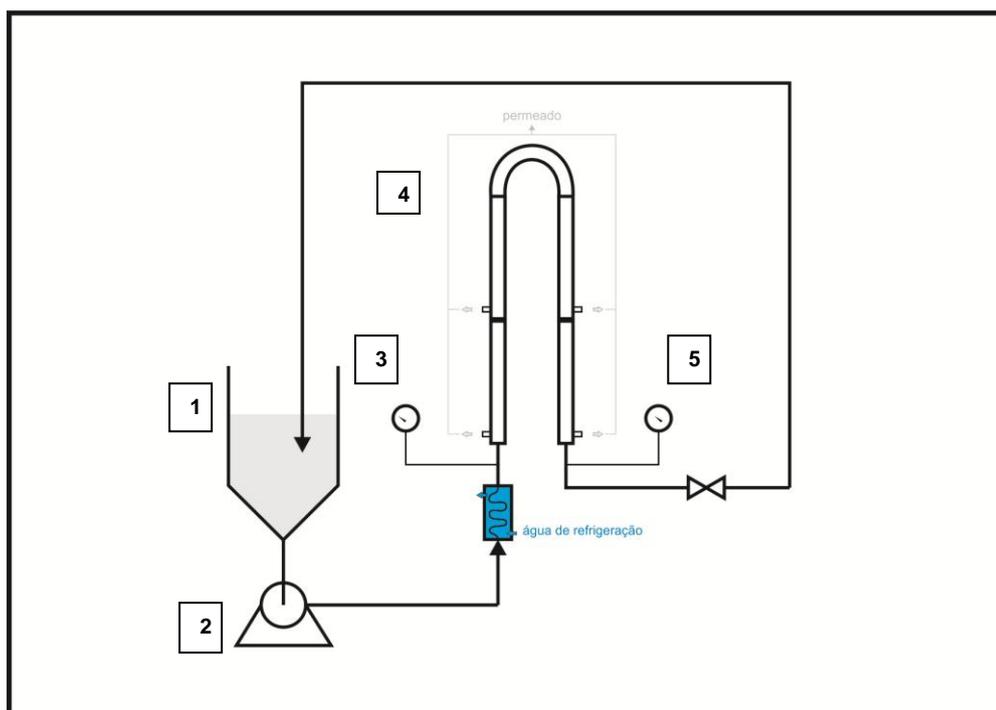
Para a concentração por UF foram testadas três temperaturas: 30°C, 40°C e 50°C, tendo como valores fixos a pressão aplicada a membrana ( $\Delta p$ ) de 5 bar, vazão de recirculação de 900 L/h e área filtrante total de 0,022 m<sup>2</sup>. O processo foi conduzido até atingir um fator de concentração volumétrico (FCV) mínimo de dois, indicando assim a sua finalização. Ao final do processo as frações obtidas, retido e permeado, foram recolhidas e, assim como a

alimentação, analisadas quanto à dosagem de proteína pelo método de Bradford (item 4.2.2.1).

A eficiência do processo foi avaliada através das medidas do fluxo permeado em intervalos de 5 minutos nos primeiros 15 minutos de processo, passando para 10 minutos de intervalo até o final do processo, conforme definido na equação 1 (item 3.4.3.1).

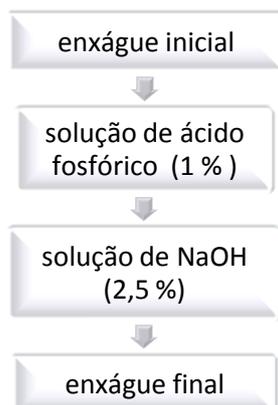
Após os testes, definiu-se a melhor temperatura para concentração das proteínas. Para os novos processos de concentração, 7 litros de soro reconstituído foram utilizados como volume inicial da alimentação, para que ao final do processo fosse obtido cerca de 3 litros de retido.

O sistema utilizado na concentração das proteínas do soro de leite reconstituído está esquematizado na Figura 10.



**Figura 10** – Esquema do processo de UF do concentrado proteico de soro de leite reconstituído. (1) Tanque de alimentação; (2) Bomba; (3) Manômetro - controla pressão de entrada; (4) Módulo de membranas tubulares; (5) Manômetro – controla pressão de saída.

A permeabilidade hidráulica do sistema de membranas é um procedimento inicial, cujo objetivo principal é avaliar o comportamento das membranas em relação à água e serve de referência para avaliação do estado das membranas antes e após a passagem de efluentes através das mesmas. Dessa forma, o processo de limpeza é etapa crucial para o reestabelecimento dessa permeabilidade. A limpeza do sistema de membranas foi realizada seguindo as etapas do fluxograma abaixo (Figura 11):



**Figura 11** - Diagrama esquemático da limpeza do sistema de UF em suas diversas etapas.

A primeira etapa foi feita com recirculação de água filtrada no sistema de UF para retirada do excesso de sujidade. Em seguida lavagem com solução de ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ) 1 % (v/v) e enxágue com água filtrada para retirada dos resíduos de solução ácida. Sucessivamente foi utilizada uma solução alcalina de NaOH 2,5 % (m/v) com adição de cloro a 400 ppm. Ao final, foi realizado enxágue com água filtrada até total limpeza e restauração do pH neutro.

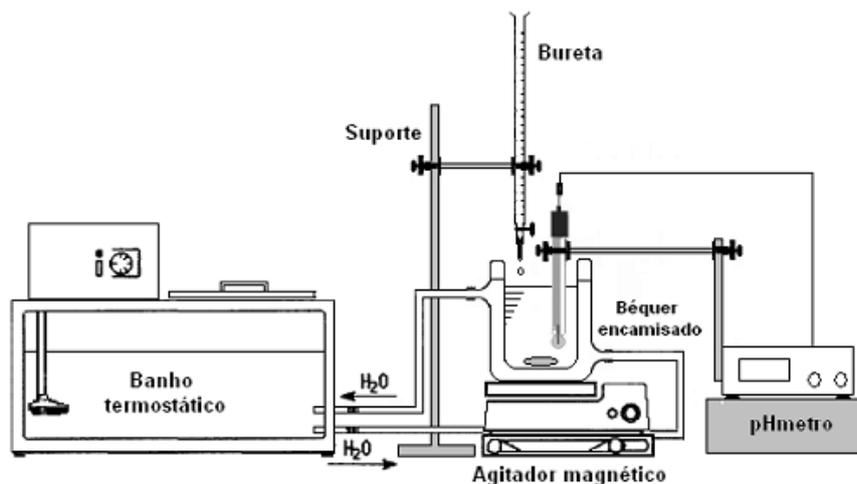
#### 4.2.1.2 Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática do concentrado proteico oriundo da UF foi realizada utilizando três condições de reação. Os ensaios experimentais foram conduzidos de acordo com as condições ótimas de cada enzima informadas pelo fabricante e corroboradas em outros trabalhos por Kurozawa et al. (2009); Santos (2009) e Nchienzia, Morawicki, Gadang (2010) e podem ser consultados na Tabela 2, a seguir.

**Tabela 2** - Condições de hidrólise enzimática das proteínas do soro de leite de acordo com a enzima utilizada

	Alcalase®	Flavourzyme®	Mistura Enzimática 50:50 (m/m) (Alcalase® + Flavourzyme®)
Temperatura (°C)	60	50	50
pH	8,0	7,0	8,0
Normalidade da base (N)	1	0,2	1
Razão enzima/substrato (g enzima/100 g proteína)	5,0	5,0	5,0

Para todos os ensaios de hidrólise, utilizou-se uma estrutura experimental laboratorial, composta de béquer de vidro encamisado 0,5L, acoplado a um banho termostático com circulação externa (modelo TE2005, Tecnal, Piracicaba, Brasil), bureta contendo solução de NaOH (Vetec, Sigma Aldrich - Rio de Janeiro, Brasil) padronizada através de titulação com biftalato de potássio (Vetec, Sigma Aldrich - Rio de Janeiro, Brasil) com fator de correção de 0,9872 para a concentração de 1N e medidor de pH e temperatura (Hanna Instruments – Romania) (Figura 12). A temperatura do soro de leite concentrado por membrana UF foi ajustada de acordo com a melhor condição de cada enzima. A amostra permaneceu sob agitação durante todo tempo de reação e o pH inicial foi ajustado adicionando NaOH.



**Figura 12** – Esquema de hidrólise pelo método pH - Stat

A reação foi monitorada de acordo com o método pH-stat (ADLER-NISSEN, 1985), mantendo o pH constante através da adição contínua de NaOH. Este monitoramento da hidrólise enzimática das proteínas do soro de leite foi realizado por acompanhamento do grau de hidrólise em função do tempo de processo.

Para o cálculo do grau de hidrólise (GH), o conteúdo de base consumida foi anotado em função do tempo, variando em intervalos de 5 minutos inicialmente e aumentando gradativamente para intervalos de 10, 15 e por fim, 30 minutos até que as variações do consumo da base fossem insignificantes.

O grau de hidrólise foi determinado pela equação (5).

$$GH(\%) = \frac{h}{h_{total}} \cdot 100 = \frac{V_b \cdot N_b}{MP \cdot \alpha \cdot h_{total}} \cdot 100 \quad (\text{Eq. 5})$$

Onde:

**h:** n° de ligações peptídicas hidrolisadas

**h<sub>total</sub>:** n° de ligações peptídicas antes da reação

**V<sub>b</sub>:** volume de base consumido

**N<sub>b</sub>:** normalidade da base adicionada durante a reação, de modo a manter o pH constante

**MP:** massa de proteína

**α:** grau de dissociação

Para obtenção do valor alfa ( $\alpha$ ), que é a dissociação dos grupos  $\alpha$ -amino, utilizou-se a equação 6.

$$\alpha = \frac{1}{1 + 10^{\text{pK} - \text{pH}}} \quad (\text{Eq. 6})$$

Onde:

**pH:** é constante

**pK:** varia com a temperatura na qual a reação é conduzida.

O valor de pK pode ser estimado de acordo com a equação 7.

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

Onde:

**T:** Temperatura (K)

Dos 3 litros de concentrado proteico obtido por UF, 500 mL foi utilizado na hidrólise enzimática para obtenção das curvas de cinética de hidrólise (GH versus tempo de reação enzimática) e o GH final alcançado para cada condição de reação. Em seguida, utilizando o mesmo substrato no volume de 1 litro, foi realizada nova hidrólise nas mesmas condições de reação utilizadas para obtenção das curvas, porém, com retirada de alíquotas em diferentes tempos de reação e, conseqüentemente, com diferentes valores de GH.

A coleta de alíquotas durante a hidrólise enzimática seguiu o seguinte protocolo: com os resultados experimentais da curva de cinética de reação, calculou-se o intervalo de GH no qual as amostras deveriam ser recolhidas do meio reacional. A seguinte equação foi utilizada (Equação 8):

$$\text{GH}_c = \frac{\text{GH}_{\text{final}}}{(n - 1)} \quad (\text{Eq. 8})$$

Onde:

**GH<sub>c</sub>:** Grau de hidrólise onde deve ocorrer a coleta.

**GH<sub>final</sub>:** Grau de hidrólise final alcançado na hidrólise enzimática para cada enzima.

**(n - 1):** N° total de alíquotas a serem coletadas, exceto o tempo zero, coletado antes da adição da enzima.

Foram coletadas 5 alíquotas do hidrolisado em diferentes graus de hidrólise (GH<sub>c</sub>) durante o tempo de reação descrito nas curvas de cinética. A inativação enzimática de cada alíquota ocorreu pelo aquecimento em banho termostático a 80°C por 15 minutos. A

caracterização dos peptídeos obtidos em cada alíquota foi feita por Tricina SDS-PAGE (item 4.2.2.2). Cada alíquota coletada durante a hidrólise enzimática teve volume total de 200 mL e foi dividida e armazenada em frascos nas seguintes condições: 180 mL congelados e posteriormente liofilizados e 20 mL mantidos congelados a -10°C. A fração liofilizada foi utilizada para análise de atividade antimicrobiana (item 4.2.4) e eletroforese Tricina SDS-PAGE (item 4.2.2.2). A fração congelada foi avaliada quanto à atividade antioxidante (métodos ORAC e ABTS, item 4.2.3) e também na quantificação dos peptídeos pelo método de tirosina (item 4.2.2.4).

## 4.2.2 Métodos analíticos

### 4.2.2.1 Dosagem de proteínas pelo método de Bradford

Este método foi escolhido por ser rápido, de alta sensibilidade, permitir analisar grande número de amostras por vez e não sofrer ação interferente de compostos como carboidratos por exemplo.

As frações oriundas da UF, assim como a alimentação, foram analisadas conforme o método. As amostras de alimentação e retido sofreram diluições prévias com água destilada para evitar que ultrapassassem a área da curva padrão. A amostra de permeado não sofreu diluição. Posteriormente, foram pipetados e transferidos para tubos de ensaio 100 µL da amostra diluída e adicionados 5 mL do reagente de Bradford. Em seguida, realizada a leitura das amostras em espectrofotômetro da marca Biospectro, modelo SP-220 em comprimento de onda de 595 nm. As análises foram realizadas em triplicata.

A concentração de proteínas foi calculada utilizando a Equação 9, obtida pela leitura dos padrões de albumina (Sigma – Aldrich).

$$Cp = \frac{Abs_{595nm} - b}{a} \quad (\text{Eq. 9})$$

Onde:

**Cp:** concentração de proteínas (mg/mL).

**Abs<sub>595nm</sub>:** Leitura de absorbância da amostra a 595 nm.

**a:** coeficiente angular da reta obtida através da curva padrão.

**b:** coeficiente linear da reta obtida através da curva padrão.

### 4.2.2.2 Tricina SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins*)

A metodologia Tricina-SDS-PAGE é comumente usada para separar proteínas de massa molecular na faixa de 1 a 100 kDa. Os hidrolisados proteicos liofilizados foram mantidos em tampão de amostra, com diferentes proporções hidrolisado:tampão durante 20 minutos a 37 °C para solubilização dos peptídeos. Para uma melhor visualização, as alíquotas

de amostra com GH igual a zero foram aplicadas na proporção de amostra:tampão 0,002 g / mL. Já para as demais alíquotas, utilizou-se a proporção de 0,010 g de hidrolisado para 400 µL de tampão. Após agitação, foram aplicados 30 µL de amostra em cada poço do gel. Na cuba contendo os géis, as soluções de tampão foram aplicadas no anodo e catodo e acionada a corrente elétrica inicial de 30 V. Assim que a amostra atingiu o gel de separação, aumentou-se a corrente elétrica para 77 V, chegando ao final da análise com valor de 100 V. Após este tempo, o gel foi retirado da placa de eletroforese e mergulhado, sob agitação, em solução corante por 1 hora, seguido de solução fixadora por mais 1 hora. Posteriormente, foi mergulhada em uma solução descorante durante 2 horas, com renovação da solução a cada 30 minutos. Após descoramento, o gel foi transferido para um suporte de papel e seco em equipamento próprio. O sistema de eletroforese utilizado foi o Protean II xi cell da Bio Rad e o padrão proteico com faixa de massa molecular ultra baixa entre 1,06 a 26,6 kDa da Sigma Aldrich.

- **Tampão de amostra:** 4 mL de SDS 10%, 0,95 mL de glicerol, 0,2 mL de mercaptoetanol, 0,001 g de comassie blue G-50, 1 mL de Tris HCl 50 mM a pH 6,8 e 3,85 mL de água Milli-Q®.
- **Tampão do gel:** Tris SDS 3M, 0,3 % a pH 8,45
- **Tampão Anodo:** Tris 0,2 M pH 8,9.
- **Tampão Catodo:** Tris 0,1 M, Tricina 0,1 M e 2g de SDS a pH 8,25.
- **Solução de Acrilamida/Bisacrilamida:** 48,5 g de acrilamida e 1g de bisacrilamida.
- **Solução fixadora:** 50% de metanol, 10% de ácido acético.
- **Solução corante:** 0,025% de comassie G 250 em ácido acético 10%.
- **Solução descorante:** ácido acético 10%.
- **Gel de empilhamento:** 1 mL da solução de Acrilamida/Bisacrilamida, 3,1 mL de tampão do gel, água Milli-Q® q.s.p 12,5 mL.
- **Gel de espaçamento:** 6,1 mL da solução de Acrilamida/Bisacrilamida, 10 mL de tampão do gel, 3,33 mL ou 4 g de glicerol, água Milli-Q® q.s.p 30 mL.
- **Gel de separação:** 10 mL da solução de Acrilamida/Bisacrilamida, 10 mL de tampão do gel, 3,33 mL ou 4 g de glicerol, água Milli-Q® q.s.p 30 mL.
- **Para polimerizar o gel de empilhamento:** 150 µL de persulfato de amônio 10 % e 30 µL de TEMED.
- **Para polimerizar o gel de separação e o gel de espaçamento:** 100 µL de persulfato de amônio 10 % e 20 µL de TEMED.

#### 4.2.2.3 Estimativa da dosagem de peptídeos pelo método da tirosina

A quantificação dos peptídeos gerados na hidrólise enzimática foi realizada segundo CHANG-LEE et al. (1989) pelo método da tirosina. A tirosina é um aminoácido aromático comumente liberado quando ocorre a hidrólise de algumas proteínas. Assim, quanto maior o grau de hidrólise, maior a concentração de tirosina, fornecendo uma estimativa da quantidade de peptídeos gerados. Neste método, as amostras são previamente preparadas através da precipitação das proteínas não hidrolisadas com TCA 10 % (ácido tricloroacético) na proporção de 1:1, TCA:hidrolisado (v/v) seguida de centrifugação e posterior leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 280 nm, na faixa do UV. Foi construída uma curva padrão de tirosina (Sigma Aldrich) com cinco pontos correspondentes às concentrações de 0,25; 0,50; 0,100; 1,3 e 1,6 µg/mL. A absorbância foi medida em espectrofotômetro da marca Biospectro, modelo SP-220. As análises foram realizadas em duplicata devido à quantidade limitada de amostra.

#### 4.2.3 Avaliação da atividade antioxidante

A avaliação da atividade antioxidante *in vitro* dos peptídeos de soro de leite foi determinada por dois métodos: ABTS e ORAC.

O radical ABTS<sup>+</sup> (ácido 2,2 azino-bis (3-etilbenzotiazolina-ácido 6-sulfônico) foi preparado com persulfato de potássio, adicionou-se em um frasco âmbar 15 mL da solução 7 mM de ABTS em água destilada e 264 µL da solução de K<sub>2</sub>SO<sub>5</sub> 140 mM. Para estabilização da solução o frasco foi deixado em repouso no escuro por aproximadamente 16 horas. Esta solução de ABTS<sup>+</sup> foi diluída em tampão fosfato de sódio pH 7,4 até atingir uma absorbância de 0,700 ± 0,020 a 734nm.

Para a construção da curva padrão de Trolox (ácido 6-hidroxi-2-5-7-8-tetrametilcromo 2-carboxílico) foram elaboradas soluções com concentrações de 20, 40, 80, 400, 800, 1200, 1600 µM em tampão fosfato pH 7,4, as quais reagiram com a solução de ABTS<sup>+</sup> (na proporção de 1:10) durante 6 minutos, e a absorbância lida à 734 nm. O branco considerado foi o tampão fosfato, lido na mesma proporção e nas mesmas condições que as amostras. A amostra em presença do radical promove a redução da absorbância devido à restauração do radical ABTS<sup>+</sup> na forma estável. A absorbância foi medida em espectrofotômetro da marca Biospectro, modelo SP-220. As análises foram realizadas em triplicata.

Ao realizar a leitura da absorbância da amostra, calcula-se a concentração da capacidade antioxidante em Equivalente Trolox (TEAC) na amostra conforme a Equação 10:

$$C_T = \frac{Abs_{734\text{ nm}} - b}{a}$$

(Eq. 10)

Onde:

**C<sub>T</sub>**: concentração da amostra em µmol Trolox.

**Abs<sup>734nm</sup>**: Leitura da absorbância da amostra e dos padrões a 734 nm.

- a:** coeficiente angular da reta obtida através da curva padrão.  
**b:** coeficiente linear da reta obtida através da curva padrão.

Já no método ORAC (oxygen radical antioxidant capacity) os parâmetros para leitura da fluorescência foram temperatura de 40 °C, comprimento de onda de excitação de 485 nm e comprimento de onda de emissão de 520 nm segundo Contreras et al (2011) e as soluções utilizadas seguiram a metodologia de Zuluetta, Esteve e Frígola, (2009) que foram: solução de fluoresceína 78 nM, preparada a partir de uma solução estoque a 78 µM e solução de AAPH (Dicloridrato de 2,2-Azobis(2-metilpropionamida) 221 mM, ambas preparadas no dia da análise. Todos os reagentes foram diluídos em solução tampão fosfato de sódio 75 mM em pH 7,4. A curva padrão de Trolox (ácido 6-hidroxi-2-5-7-8-tetrametilcromo 2-carboxílico) foi construída a partir de uma solução estoque de 500 µM. Foram considerados sete pontos na curva com concentrações de 20, 30, 40, 60, 80, 100 e 120 µmol Trolox.L<sup>-1</sup>. As amostras foram diluídas em tampão fosfato de sódio 75 mM pH 7,4 para que atingissem a concentração entre 20 a 120 µmol Trolox.L<sup>-1</sup>. Para os hidrolisados da Flavourzyme (F1 a F4) o fator de diluição foi de 1:40, para F5 o fator de diluição foi de 1:50 e para os hidrolisados da Alcalase (A1 a A5) e mistura de enzimas (M1 a M5) fator de diluição de 1:100. O equipamento utilizado nesta análise foi R Chisto – modelo infinite M200 da Tecan (Suíça) com leitor de microplacas de poliestireno, com 96 poços de aplicação na cor preta. Foram aplicados 80 µL de amostra e dispensados pelo equipamento 80 µL de fluoresceína, 40 µL de AAPH, perfazendo um volume total de 200 µL em cada poço. A fluorescência foi registrada durante 150 ciclos por cerca de 3 horas. Os resultados foram registrados através do software de controle i-control. Utilizando o programa computacional GraphPad Prism 5.0 (San Diego, E.U.A) os dados de leitura oriundos da fluorescência em relação ao tempo foram plotados, e calculou-se a área abaixo da curva (AUC). Todas as amostras foram lidas em triplicata e os resultados expressos de acordo com a equação 11:

$$ORAC (\mu M TE) = \frac{C_{Trolox} \cdot (AUC_{amostra} - AUC_{branco}) \cdot \kappa}{(AUC_{Trolox} - AUC_{branco})} \quad (Eq. 11)$$

Onde:

**TE:** Trolox equivalente

**C<sub>Trolox</sub>:** Concentração de Trolox (µM).

**κ:** fator de diluição da amostra.

**AUC<sub>amostra</sub>:** Área abaixo da curva do decaimento da fluorescência para a amostra.

**AUC<sub>branco</sub>:** Área abaixo da curva do decaimento da fluorescência para o branco.

**AUC<sub>Trolox</sub>:** Área abaixo da curva do decaimento da fluorescência para o padrão de Trolox.

#### 4.2.4 Avaliação da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi avaliada contra cepas de *Salmonella choleraesuis* subsp. *Enteritidis* CT (ATCC 13076) e *Listeria monocytogenes*, (ATCC 9117) devido à sua

importância em alimentos, com base na metodologia de difusão em ágar, descrita por Wan, Wilcock e Coventry, (1998).

As bactérias foram ativadas em meio de cultura ágar soja tripticaseína (TSA - *Tryptic Soy Agar*, Difco – Becton, Dickinson and Company, França) a 45 °C para *Salmonella* e ágar soja tripticaseína suplementado com extrato de levedura (TSAYE - *Tryptic Soy Agar Yeast Extract*, Bacto - Becton, Dickinson and Company, França) a 45 °C para *Listeria*. Elas foram incubadas de um dia para o outro em temperatura adequada ao crescimento (37 °C para *Salmonella* e 30 °C para *Listeria*). Em seguida, foi preparado um inóculo padronizado de cada microrganismo, onde foi transferida para uma solução salina a quantidade de cultura bacteriana necessária para atingir 0,3 na escala Mcfarland, obtida através da leitura no densitômetro (Densimat – Biomeriëux, França), o que corresponde a  $1 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> em cada tubo de suspensão. A partir dessa suspensão, foram feitas diluições sucessivas de 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup> e 10<sup>-7</sup> e estas transferidas para placas de Petri, em duplicata, para posterior incubação pelo método *pour plate* e contagem em das unidades formadoras de colônia (UFC).

Para 250 mL de meio de cultura, adicionou-se 250 µL do inóculo padronizado de cada bactéria. Foram transferidos aproximadamente 70 mL de cada meio de cultura contendo os microrganismos para placas de Petri grandes e, após solidificação, foram feitos os poços de aplicação. Os hidrolisados a serem testados foram liofilizados, solubilizados em tampão fosfato de sódio pH 7,4. Para 1 g de liofilizado, foi necessária adição de 5 mL de tampão para total solubilização, partindo assim da solução mais saturada possível. O controle negativo consistiu na aplicação do mesmo tampão usado na diluição do hidrolisado e o controle positivo uma solução de clorexidina a 0,12 %. Foram aplicados em seus respectivos poços a solução saturada de peptídeos, em duplicata, o controle negativo e o controle positivo no volume de 40 µL.

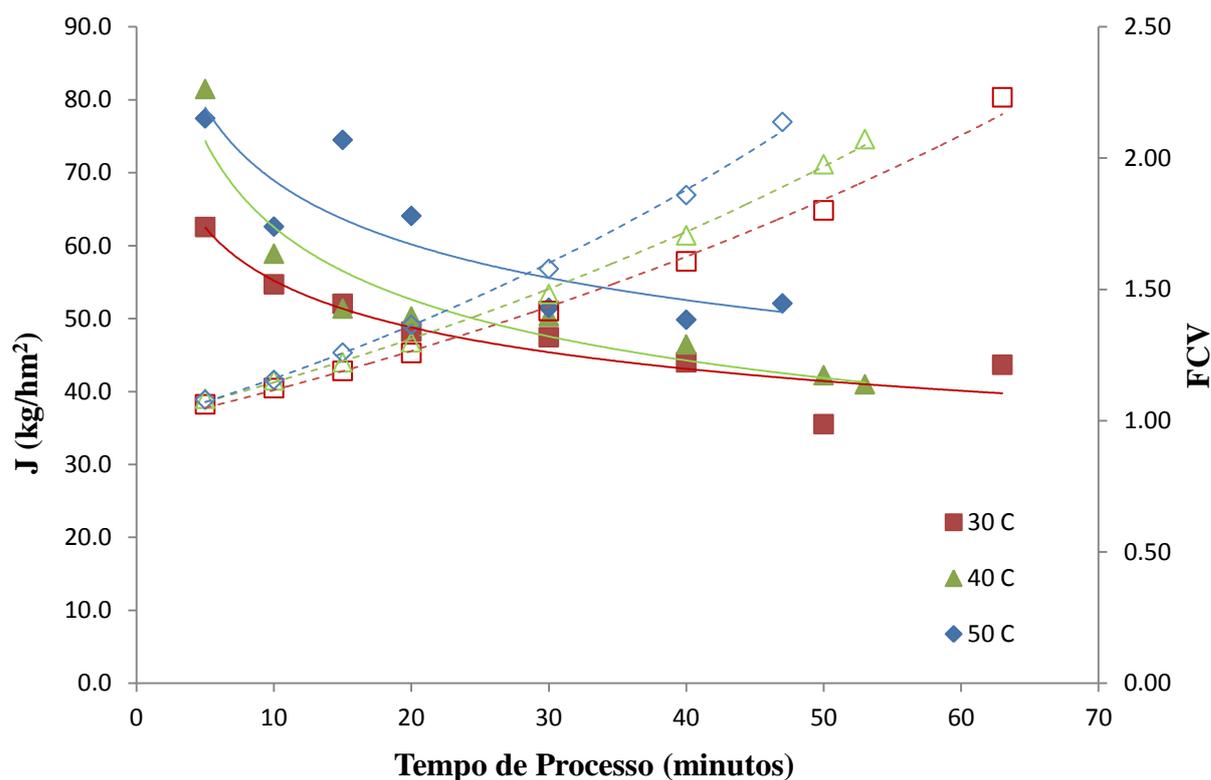
#### **4.2.5 Análise Estatística**

Os resultados experimentais foram analisados estatisticamente pelo programa XLSTAT versão 7.5, (Addinsoft, 1995-2004) através da Análise de Variância (ANOVA) aplicando-se o Teste de Tukey ao nível de 5 % de significância.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Concentração das Proteínas do Soro por UF

Os resultados obtidos na concentração das proteínas do soro de leite reconstituído utilizando três diferentes temperaturas são ilustrados na Figura 14, a seguir.



**Figura 13** - Evolução do fluxo permeado e do Fator de Concentração Volumétrica. Onde: Fluxo de permeado (J) e Fator de Concentração Volumétrica (FCV) ao longo da ultrafiltração do soro reconstituído nas três diferentes temperaturas testadas. Linha contínua: (J); Linha pontilhada: (FCV).

Na Figura 13, é possível observar o comportamento das curvas de fluxo de permeado (J) e do fator de concentração volumétrica (FCV) ao longo do processo de ultrafiltração do soro. É possível identificar um grande decréscimo inicial no fluxo de permeado em todas as temperaturas testadas nos primeiros 20 minutos de processo, até alcançar estabilização. Isto se deve possivelmente à camada de polarização formada na superfície da membrana contribuindo para maior resistência à passagem do efluente através da mesma. Este mesmo comportamento de fluxo foi verificado por outros autores no processo de UF do soro de leite (ATRA, et al., 2005; BALDASSO, BARROS e TESSARO, 2011). O fluxo médio de permeado obtido ao final da UF do soro de leite reconstituído pode ser visualizado na Tabela 3 a seguir.

**Tabela 3** – Fluxo médio de permeado da UF do soro de leite nas diferentes temperaturas

Temperatura	Fluxo médio de permeado (kg/hm <sup>2</sup> )
30 °C	46,4
40 °C	51,4
50 °C	59,0

Nota-se a influência da temperatura no fluxo de permeado, que atinge maiores valores com a elevação da temperatura. Portanto, a maior taxa de fluxo de permeado foi obtida na temperatura de 50 °C e a menor taxa aos 30 °C. Comportamento semelhante foi observado por outros autores na UF do soro de leite.

Atra et al. (2005), avaliando diversas condições para a UF do soro de leite, dentre elas a influência da temperatura sobre o fluxo de permeado, obtiveram o maior fluxo aos 50 °C, com taxa de 30 L/hm<sup>2</sup>. O mesmo comportamento foi obtido por Konrad, Kleinschmidt e Faber (2012), para UF do soro de leite ácido, comprovando que o aumento da temperatura de 35 °C para 50 °C resultou no aumento do fluxo de permeado, alcançado um fluxo médio de 28,1 kg/hm<sup>2</sup>. A justificativa para este padrão de comportamento é que um aumento de temperatura diminui a viscosidade da alimentação elevando a difusividade do soluto e a taxa de transporte de solutos e fluxo de massa através da membrana, resultando assim num aumento da taxa de fluxo do permeado.

Possivelmente, a maior taxa de fluxo de permeado obtida no presente trabalho em comparação com os demais autores, se deve a diferentes condições utilizadas no processo de UF como vazão de recirculação e pressão transmembrana. Aumento nesses parâmetros, até certo limite, influencia positivamente no fluxo de permeado.

Na Tabela 4, está descrito o tempo total de cada processo assim como o fator de concentração volumétrica alcançado em cada temperatura. O fator de concentração volumétrica, definido como a relação entre o volume de alimentação inicial e o volume da corrente retida pela membrana, foi fixado em dois e atuou como o sinalizador do final do processo de UF. Nota-se que o FCV final foi atingido em tempos diferentes para cada temperatura utilizada e está diretamente relacionado ao fluxo de permeado. Quanto maior o fluxo de permeado, ocorrido na temperatura de 50 °C, menor tempo para atingir FCV = 2, sendo fluxo de permeado e tempo para atingir determinado FCV, inversamente proporcionais.

**Tabela 4** – Fator de concentração volumétrica (FCV) e tempo final de processo obtido em cada temperatura testada.

Temperatura	FCV	Tempo de processo (minutos)
30 °C	2,23	63
40 °C	2,07	50
50 °C	2,14	47

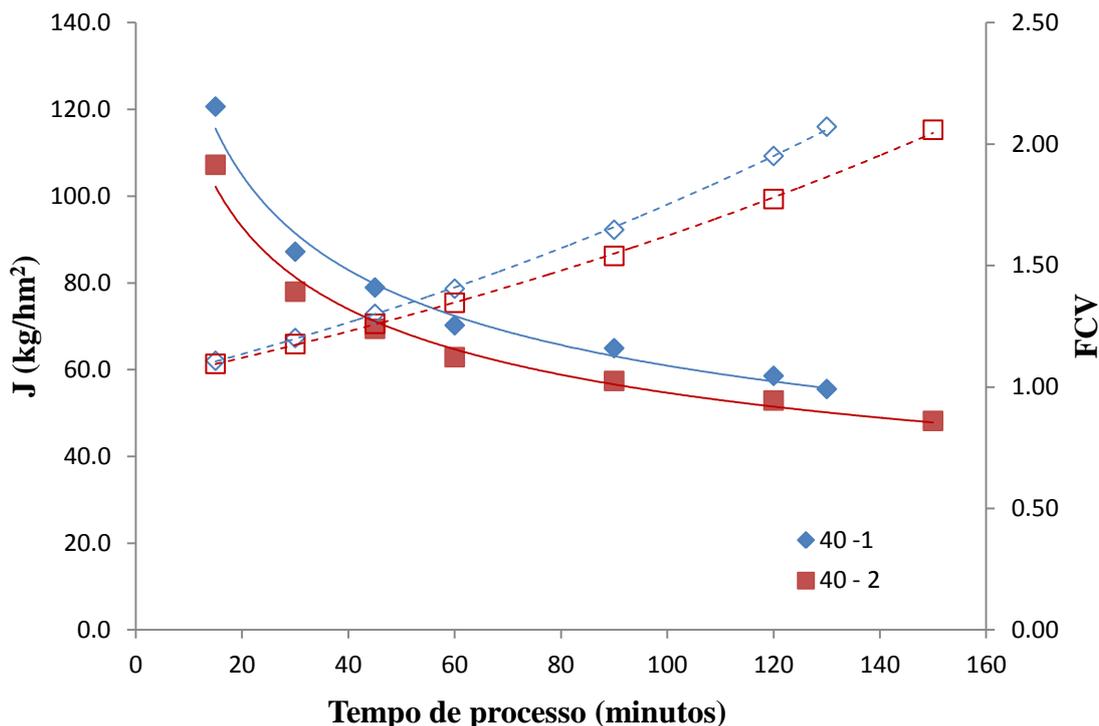
O coeficiente de rejeição, que consiste na razão entre a concentração do soluto de interesse no permeado e na alimentação, foi de 99,4; 98,3 e 99,0 para as temperaturas de 30, 40 e 50 °C, respectivamente, demonstrando a ótima capacidade de retenção de proteínas pela membrana de UF. Houve perda irrisória de proteína na fração de permeado em todas as temperaturas, que se deve à natureza heterogênea da membrana, a qual pode conter pequeno percentual de poros de tamanho maior, permitindo assim a permeação dessas proteínas. Foi observado que a partir da temperatura de 40 °C, o incremento térmico não implicou em aumento da concentração proteica na fração retida, não sendo justificável utilizar temperaturas mais altas (Tabela 5). É importante ressaltar que além do estresse mecânico sofrido pelas proteínas (BELMEJDOUB et al., 2012), o que não necessariamente resulta na perda de sua funcionalidade, há o acréscimo do incremento na temperatura, o que pode causar certo grau de desnaturação proteica. Dessa forma, escolheu-se como condição ideal o processamento na temperatura de 40 °C, com a finalidade de economizar no custo energético do processo e minimizar as condições que possam propiciar a desnaturação.

**Tabela 5** – Concentração de proteína nas diferentes frações obtidas no PSM nas três temperaturas testadas

Temperatura	30 °C	40 °C	50 °C
Fração	Concentração de proteína mg/mL (média ± desvio padrão)		
AL	0,990 ± 0,67	0,650 ± 0,08	0,610 ± 0,67
RE	1,360 ± 0,50	1,670 ± 0,82	1,550 ± 0,17
PE	0,006 ± 0,67	0,011 ± 0,42	0,006 ± 0,85
Razão RE:AL	1,37	2,57	2,54

Onde: (AL) Alimentação; (RE) Retido; (PE) Permeado; RE:AL (relação entre as concentrações de proteína nessas frações).

Após definição da melhor temperatura para concentração das proteínas, foram realizados mais dois processos com volume inicial de alimentação de 7 litros, obtendo ao final cerca de 3,5 litros de soro concentrado, utilizado como substrato proteico na etapa seguinte de hidrólise enzimática (Figura 14).

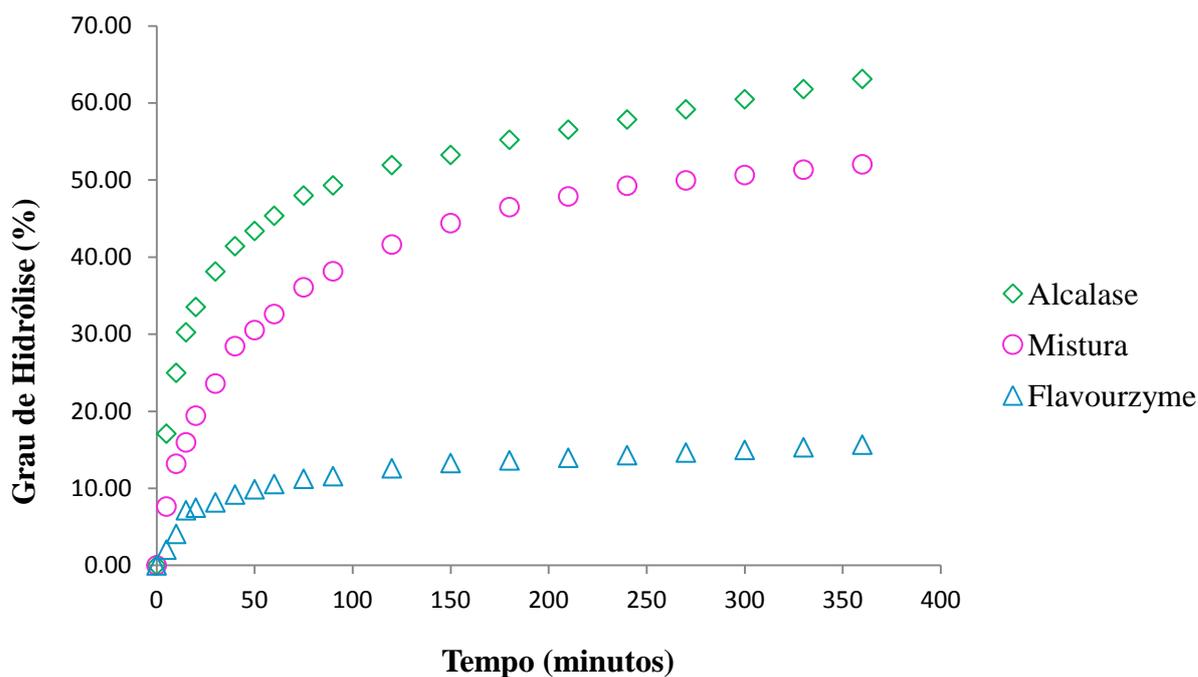


**Figura 14** - Gráfico comparativo das duplicatas da ultrafiltração do soro reconstituído na temperatura de 40 °C. Onde: Fluxo de permeado (J) e Fator de Concentração Volumétrica (FCV). Linha contínua: (J) e linha pontilhada (FCV)

Em cada processo a 40 °C o fluxo médio de permeado obtido foi de 74,0 kg/hm<sup>2</sup> e 63,4 kg/hm<sup>2</sup>, no primeiro e segundo processo respectivamente, sendo o valor médio entre os dois processos de 68, 7 kg/hm<sup>2</sup>, com desvio padrão calculado de 7,49 e coeficiente de variação de 10,9 %.

## 5.2 Hidrólise Enzimática do Soro de Leite Concentrado por UF

As curvas de cinética de hidrólise enzimática do soro de leite concentrado por membrana para as diferentes enzimas utilizadas estão expostas na Figura 15, onde são observados os diferentes graus de hidrólise alcançados em cada condição de reação.



**Figura 15** – Curvas de cinética de hidrólise enzimática das proteínas do soro de leite com as diferentes enzimas comerciais e a mistura enzimática.

Foi observado um comportamento comum a todas as curvas, com uma alta taxa de hidrólise inicial, devido ao elevado número de ligações peptídicas clivadas na primeira hora de reação. Após este período de tempo, foi verificada uma redução na taxa de hidrólise, que foi mantida até o fim de cada experimento, por volta dos 360 minutos, onde o consumo de base torna-se insignificante, caracterizando o final do processo. Este comportamento é similar ao obtido com a hidrólise de peito de frango (KUROZAWA, PARK, HUBINGER, 2009b), músculo de salmão (KRISTINSSON, RASCO, 2000b) e proteína do soro de leite (SPELLMAN et al., 2003). Essa diminuição da velocidade de reação após os primeiros 60 minutos pode ocorrer por diversos fatores dentre os quais: inibição potencial da enzima pelos produtos gerados, efeito da concorrência entre produto e substrato, diminuição de sítios de hidrólise disponíveis ou ainda pela autodigestão enzimática.

As cinéticas de hidrólise enzimática neste trabalho revelam ainda que valores mais elevados de grau de hidrólise foram alcançados com o uso da Alcalase, uma endopeptidase, e os menores valores de grau de hidrólise com o uso da Flavourzyme, uma exopeptidase devido aos diferentes mecanismos de reação, nos quais há formação de diferentes produtos de hidrólise, com formação maior ou menor de intermediários ou de produtos finais. Os valores finais de GH alcançados neste experimento foram de 15 %, 52 % e 63 % com uso da Flavourzyme, mistura enzimática e Alcalase, respectivamente. Este resultado se deve à diferença de ação catalítica das duas enzimas, que possuem acessibilidade específica na cadeia proteica para que a reação ocorra. Endopeptidases agem em sítios específicos no interior da cadeia polipeptídica e geralmente são empregadas quando objetiva-se diminuição rápida da massa molecular média de peptídeos. Já exopeptidases, agem em sítios específicos nas extremidades da cadeia polipeptídica, sendo destinadas à hidrólise de oligopeptídeos para

transformá-los em aminoácidos (PARKIN, FENNEMA e DAMODARAN, 2010, SANTOS, 2009).

Kim et al. (2007), que testaram diferentes enzimas na hidrólise de proteínas do soro de leite, constataram que a hidrólise máxima das frações proteicas  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg foi alcançada com o uso de Alcalase. Perea et al. (1993), utilizando Alcalase, razão E/S de 2 %, obteve 16 % e 20 % de GH para as frações purificadas de  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg respectivamente. Já Li-jun, Chuan-he, Zheng (2007), utilizando Alcalase e razão E/S de 3 % na hidrólise de proteínas do soro, obtiveram GH de 20 %. No entanto, apesar da Alcalase ter se mostrado mais efetiva na produção de hidrolisados do soro, nota-se que no presente trabalho o GH final teve um valor mais elevado em comparação aos dos trabalhos citados anteriormente. A possível justificativa está no processamento da matéria-prima antes da hidrólise. Alguma espécie de desnaturação pode estar ocorrendo com as proteínas do soro durante o processo de UF, facilitando assim o ataque da enzima às ligações peptídicas.

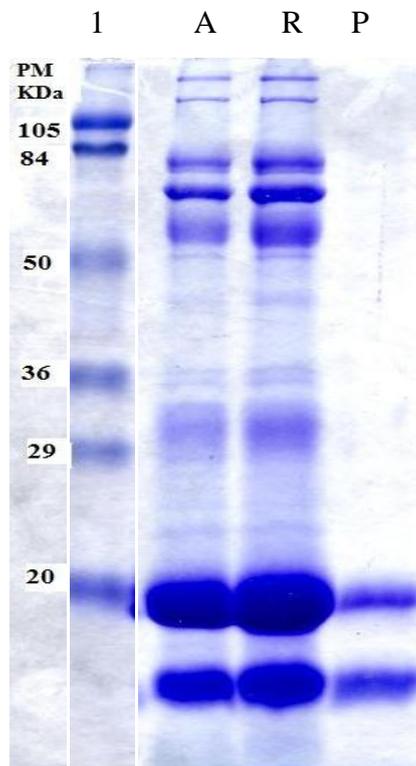
Em ensaios preliminares de hidrólise realizados neste trabalho (Anexo A), utilizando concentrado proteico de soro em pó reconstituído para 5 % de proteína e nas mesmas condições de reação aplicadas ao soro concentrado por membranas, observou-se um GH médio de 26 % com desvio padrão entre 0,04 a 1,3 para Alcalase; 8,3 % e desvio padrão entre 0,01 a 0,13 para Flavourzyme e 27 % com desvio padrão entre 0,21 a 2,7 para a mistura enzimática. As taxas de GH do soro reconstituído alcançaram valores inferiores em comparação às taxas do soro concentrado por membranas. Segundo Belmejdoub et al (2012), usando a técnica de emissão de fluorescência e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa, foi concluído que as proteínas do soro sofrem leve desnaturação quando submetidas à UF devido ao estresse mecânico, o que por sua vez permite maior ação enzimática, justificando assim esses valores. Vale ressaltar que os valores dos desvios padrão calculados para os ensaios preliminares estão entre 0,01 a 2,7, demonstrando boa repetibilidade dos ensaios. Segundo trabalho realizado por Imm e Lee (1999), o GH não foi substancialmente alterado pela diluição do substrato proteico, o que seria um problema somente caso a viscosidade do substrato fosse fortemente modificada a ponto de dificultar a distribuição da enzima e seu contato com as proteínas.

Acreditou-se que a mistura de Alcalase e Flavourzyme seria mais efetiva na obtenção de maior GH devido à combinação de seus diferentes modos de ação, porém, o resultado final não foi como esperado, no qual a hidrólise com Alcalase resultou em maior GH. Possivelmente, como cada enzima tem diferente valor ótimo de pH, ao serem utilizadas em conjunto, o pH da reação foi ajustado ao ótimo da Alcalase, que é uma unidade acima do ótimo para Flavourzyme, dificultando a ação combinada. A destinação final do hidrolisado proteico vai depender do GH alcançado e do perfil peptídico resultante ao final do processo de hidrólise. Segundo Benítez, Ibarz e Pagan (2008), os hidrolisados podem ser classificados segundo o GH em (i) baixo GH, entre 1 e 10 %, e utilizado na melhora de propriedades funcionais dos alimentos; (ii) variável GH, utilizado como saborizante e (iii) extenso GH, superior a 10 %, utilizado em alimentação especializada, como fórmulas infantis e nutrição enteral.

Nas Figuras 17, 18 e 19 e 20 observa-se o perfil eletroforético dos hidrolisados proteicos de soro de leite ao longo da hidrólise com as diferentes enzimas. O gel de Tricina SDS-PAGE é elaborado a partir de concentrações diferentes de acrilamida. O topo do gel possui maior concentração de acrilamida (10%), para que retenha as proteínas de maior massa molecular não hidrolisadas. Já a base do gel corresponde a uma menor concentração de acrilamida (4%) no qual ficam retidos os peptídeos gerados na hidrólise enzimática. Foram

coletadas 5 alíquotas em diferentes tempos de reação enzimática com, conseqüentemente, diferentes graus de hidrólise.

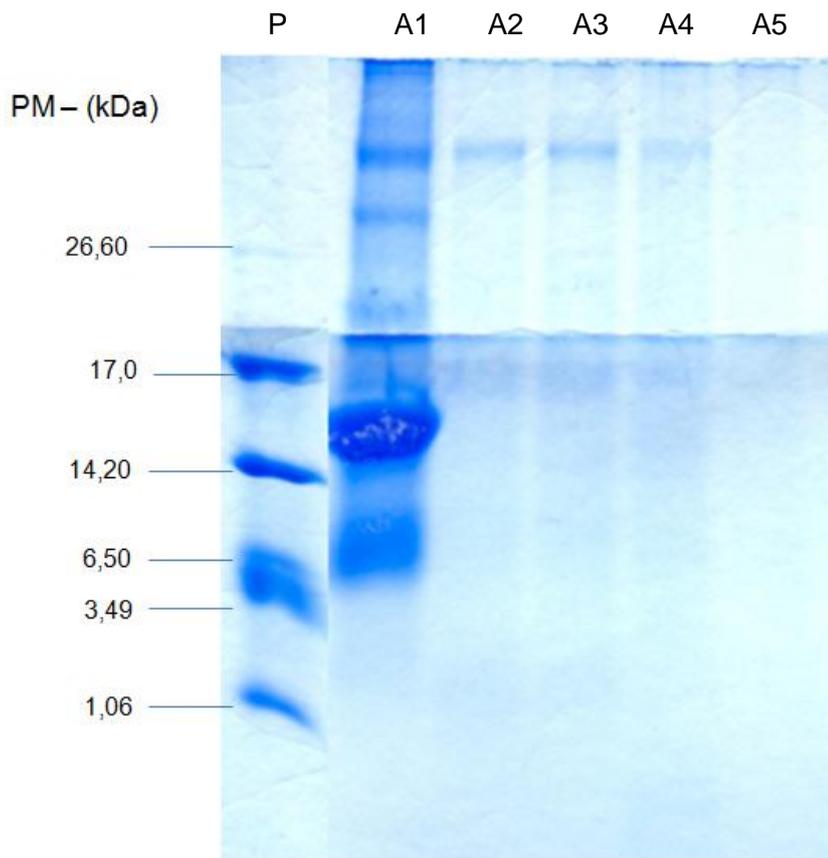
O perfil eletroforético típico das proteínas do soro de leite encontra-se a seguir na Figura 16:



**Figura 16** – Perfil eletroforético (Eletroforese SDS-PAGE) típico das proteínas do soro de leite. Frações submetidas à UF. Onde Padrão (1), Alimentação (A), Retido (R) e Permeado (P).

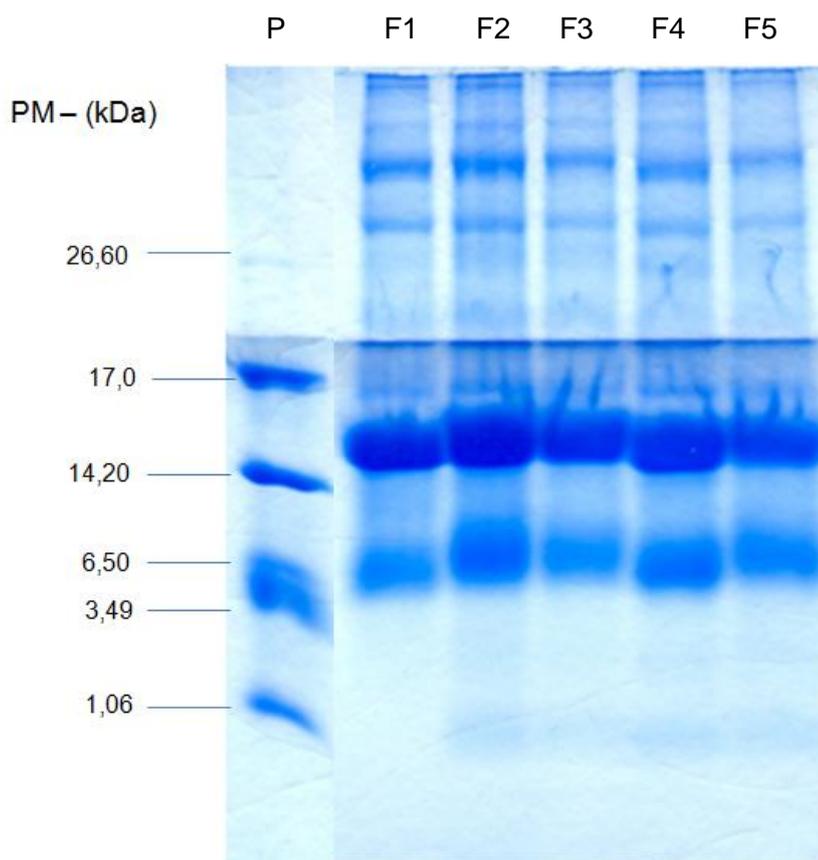
Na Figura 16 pode ser visualizada a presença de 14 cadeias polipeptídicas tanto na alimentação quanto no soro concentrado por membranas. Já no permeado da UF foram verificadas duas cadeias polipeptídicas. Estas cadeias são referentes às proteínas majoritárias no soro de leite,  $\beta$ -lactoglobulina e  $\alpha$ -lactalbumina com peso molecular de 18 e 14 KDa respectivamente. Assim, pode-se verificar a eficiência da membrana de UF, com faixa de corte entre 10 e 20 KDa, na separação destas proteínas das outras caseínas remanescentes no soro, principalmente por que a fração concentrada apresentou coloração mais intensa das suas bandas proteicas.

A seguir serão verificados os perfis peptídicos das diferentes alíquotas dos hidrolisados.



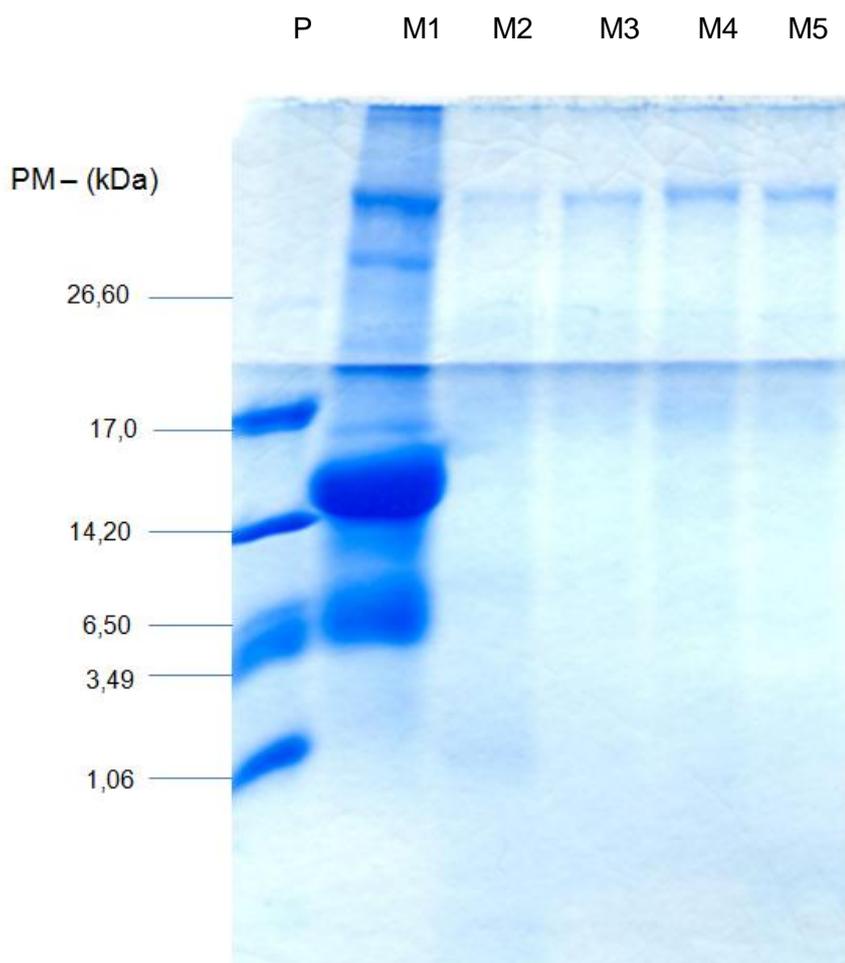
**Figura 17** - Perfil eletroforético (Tricina SDS – PAGE) de hidrolisados proteicos de soro de leite com a enzima Alcalase. Onde: Padrão de ultra baixo peso molecular Sigma Aldrich (P), (A1, A2, A3, A4, A5) alíquotas do hidrolisado com a enzima Alcalase.

Na Figura 17, é possível verificar o perfil eletroforético das alíquotas da Alcalase, no qual a primeira alíquota se apresenta com bandas proteicas mais intensamente coradas, correspondente às frações  $\beta$ -Lactoglobulina (18 kDa) e  $\alpha$ -Lactalbumina (14 kDa) não hidrolisadas, o que é bastante coerente, pois esta primeira alíquota foi retirada antes da adição da enzima, como amostra controle. As demais alíquotas foram reaplicadas em maior concentração para melhor resolução do perfil eletroforético e melhor visualização dos peptídeos (Figura 20).



**Figura 18** - Perfil eletroforético (Tricina SDS – PAGE) de hidrolisados proteicos de soro de leite com a enzima Flavourzyme. Onde: Padrão de ultra baixo peso molecular Sigma Aldrich (P), (F1, F2, F3, F4, F5) alíquotas do hidrolisado com a enzima Flavourzyme.

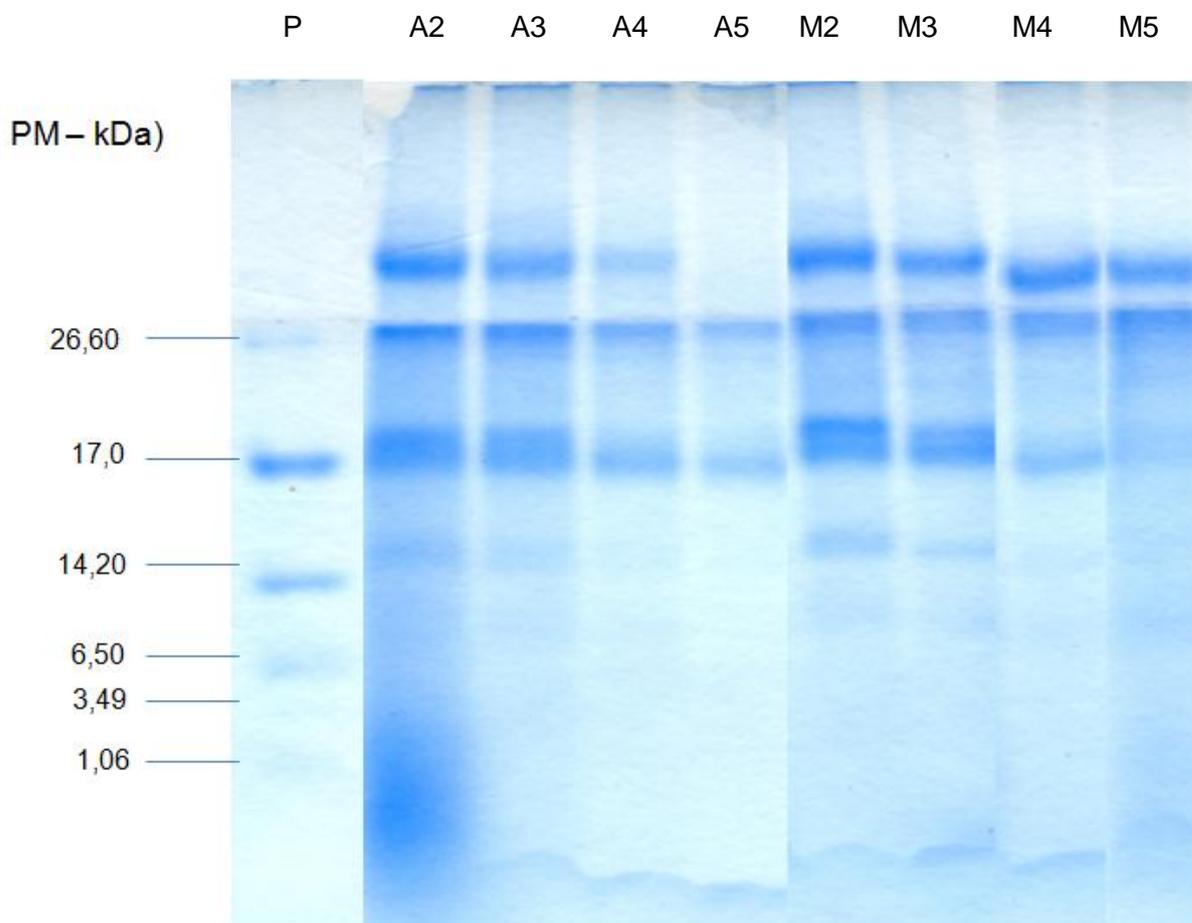
Nota-se na Figura 18, para as alíquotas da Flavourzyme uma coloração intensa, correspondente às frações proteicas não hidrolisadas de  $\beta$ -Lactoglobulina (18 kDa) e  $\alpha$ -Lactalbumina (14 kDa) e formação de bandas de peptídeos na faixa de 1 kDa em pequena proporção comprovando que houve pequena taxa de hidrólise proteica.



**Figura 19** - Perfil eletroforético (Tricina SDS – PAGE) de hidrolisados proteicos de soro de leite com a mistura enzimática. Onde: Padrão de ultra baixo peso molecular Sigma Aldrich (P), alíquotas do hidrolisado com a mistura enzimática (M1, M2, M3, M4, M5).

Na Figura 19, é possível verificar o perfil eletroforético das alíquotas da mistura enzimática, no qual semelhante ao ocorrido com a Alcalase, a primeira alíquota se apresenta com bandas proteicas mais intensamente coradas, correspondente às frações  $\beta$ -Lactoglobulina (18 kDa) e  $\alpha$ -Lactalbumina (14 kDa) não hidrolisadas. As demais alíquotas foram reaplicadas em maior concentração para melhor resolução do perfil eletroforético e melhor visualização dos peptídeos (Figura 20).

A seguir temos o perfil eletroforético das alíquotas da Alcalase e da mistura enzimática reaplicadas em maior concentração para melhor visualização dos peptídeos (Figura 20).



**Figura 20** - Perfil eletroforético (Tricina SDS-PAGE) de amostras de soro de leite hidrolisado. Onde: Padrão ultra baixo Sigma Aldrich (P), alíquotas do hidrolisado com a enzima Alcalase A2, A3, A4, A5 e alíquotas do hidrolisado da mistura enzimática M2, M3, M4, M5.

Observa-se (Figura 20) para as alíquotas da Alcalase o gradual desaparecimento no topo do gel das bandas proteicas com massa molecular acima de 26 kDa, demonstrando assim que houve a clivagem destas ao longo da hidrólise. Também é importante salientar que as bandas de proteína não hidrolisada apresentam-se mais fracamente coradas em comparação às primeiras alíquotas A1 e M1 (Figuras 17 e 19) da Alcalase e mistura enzimática respectivamente, mesmo depois de serem concentradas. Há uma impossibilidade em visualizar os peptídeos gerados, sugerindo que houve extensa hidrólise proteica, com formação de peptídeos de peso molecular inferior a 1 kDa. Para A2, reforça-se essa evidência pela presença de uma banda difusa e de coloração intensa na faixa entre 3 e 1 kDa na alíquota A2, que desaparece nas alíquotas seguintes, A3, A4 e A5, coletadas posteriormente.

Ainda na Figura 20, para o perfil da mistura enzimática, as alíquotas M2 e M3 apresentam-se mais fortemente coradas, principalmente próximo à faixa de 17 kDa, o que corresponde à fração  $\beta$ -Lactoglobulina não hidrolisada, em comparação às alíquotas M4 e M5, que se apresentam mais fracamente coradas, indicando que houve clivagem das proteínas ao longo da hidrólise. Observa-se também, leve coloração na faixa de 6 kDa para as alíquotas da mistura enzimática, sugerindo uma ligeira formação de peptídeos com essa massa molecular em maior proporção.

Lakshman et al. (2011) obtiveram valores de GH, após 5 horas de reação, variando entre 20% para pepsina e 40% para tripsina. Também foram realizados testes com enzimas de fungos do gênero *Monascus*, na qual foram alcançados valores de GH intermediários dentro deste intervalo de GH das enzimas tripsina e pepsina. Já a combinação das enzimas fúngicas com a tripsina acarretou GH ligeiramente acima dos 40 %. Segundo os autores, com realização de eletroforese, verificou-se que somente as caseínas remanescentes no soro foram completamente digeridas em todas as condições enzimáticas realizadas, enquanto as frações  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg foram totalmente digeridas pelas enzimas fúngicas e parcialmente digeridas pelas enzimas pepsina e tripsina. Também foi constatado, por eletroforese Tricina SDS PAGE, que os hidrolisados de tripsina ou pepsina tiveram massa molecular abaixo de 10 kDa mas, contendo ainda frações de  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg não digeridas. Com a combinação de enzima fúngica e tripsina observou-se extensa hidrólise e desaparecimento das bandas proteicas após 5 horas de reação, semelhante ao ocorrido no presente trabalho pela hidrólise com Alcalase e mistura enzimática.

### 5.3 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante das diferentes amostras obtidas através de hidrólise enzimática foi medida pelos métodos ORAC e ABTS e paralelamente quantificada quanto à estimativa do teor de peptídeos, pelo método da tirosina, o que nos permite ter uma ideia da quantidade de peptídeos liberados na hidrólise. Os resultados da atividade antioxidante foram expressos em  $\mu\text{mol}$  de Trolox equivalente ( $\mu\text{mol TE}$ ) e estão apresentados nas Figuras 21 e 22. Os dados foram analisados estatisticamente preferencialmente entre as alíquotas de uma mesma enzima devido ao diferente GH final alcançado em cada reação.

Para a enzima Flavourzyme, os valores de atividade antioxidante das diferentes alíquotas variaram entre 1615 a 2920  $\mu\text{M TE}$  (ORAC) e 597 a 1092  $\mu\text{M TE}$  (ABTS) com concentração de tirosina entre 0,50 a 1,44  $\mu\text{g/mL}$  e GH variando de 3,8 a 15 %. Houve boa correspondência entre a concentração estimada de peptídeos, com base na dosagem da concentração de tirosina de cada alíquota e a atividade antioxidante, a qual se apresentou mais elevada quanto maior a concentração de tirosina em ambos os métodos avaliados (Figuras 21 e 22).

Com a enzima Alcalase, foram alcançados os maiores valores de atividade antioxidante os quais variaram entre 3092 a 7567  $\mu\text{M TE}$  (ORAC) e 998 a 6290  $\mu\text{M TE}$  (ABTS) com concentração de tirosina de 1,80 a 9,25  $\mu\text{g/mL}$  e GH variando de 15,7 a 63 % entre as alíquotas. Houve boa correspondência entre a concentração estimada de peptídeos e a atividade antioxidante para o método ORAC, onde quanto a maior a concentração de tirosina, maior a atividade antioxidante, não havendo esta correlação para as alíquotas A2, A3 e A4 pelo método ABTS (Figuras 21 e 22).

Já com as alíquotas da mistura enzimática os valores de atividade antioxidante variaram entre 2547 a 5903  $\mu\text{M TE}$  (ORAC) e 913 a 2678  $\mu\text{M TE}$  (ABTS) com concentração de tirosina entre 1,58 a 7,60  $\mu\text{g/mL}$  e GH variando de 13 a 52 %. Apresentou boa correspondência entre concentração estimada de peptídeos e atividade antioxidante para ambos os métodos (Figuras 21 e 22).

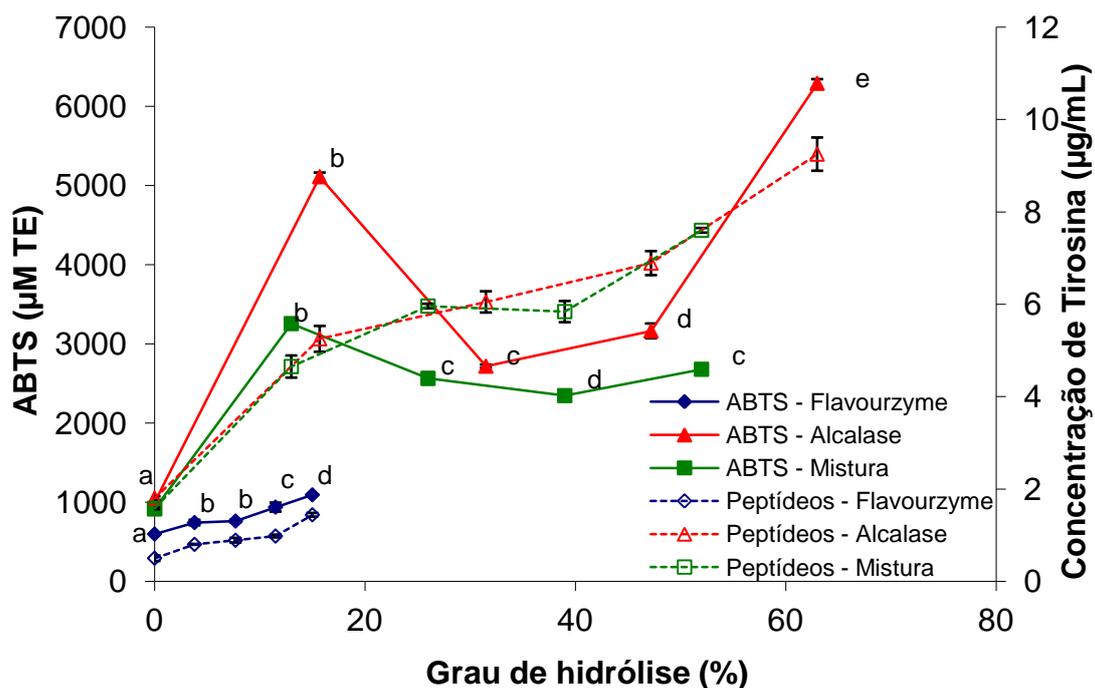
As variações nos valores de atividade antioxidante obtidas entre as diversas alíquotas e as diferentes enzimas se justificam pela diferença na ação catalítica e nos produtos formados em cada condição de hidrólise e em cada tempo de reação enzimática.

Os menores valores foram alcançados com a Flavourzyme, uma exopeptidase, enzima que age nas extremidades da cadeia polipeptídica, formando peptídeos de maior massa molecular. Já a Alcalase atua em sítios específicos no interior da cadeia polipeptídica, sendo responsável pela geração de peptídeos de menor massa molecular. De acordo com a literatura, quanto menor a massa molecular dos peptídeos, maior a atividade antioxidante atribuída ao hidrolisado (CONTRERAS et al., 2011, CARRASCO-CASTILLA et al., 2012; RANAMUKHAARACHCHI, MEISSNER e MORESOLI, 2013), justificando assim os baixos valores obtidos com as alíquotas da Flavourzyme e os maiores valores obtidos com a Alcalase, que forma peptídeos menores (confirmado pelo perfil eletroforético – item 5.2, figura 20) aos quais se atribui maior capacidade antioxidante.

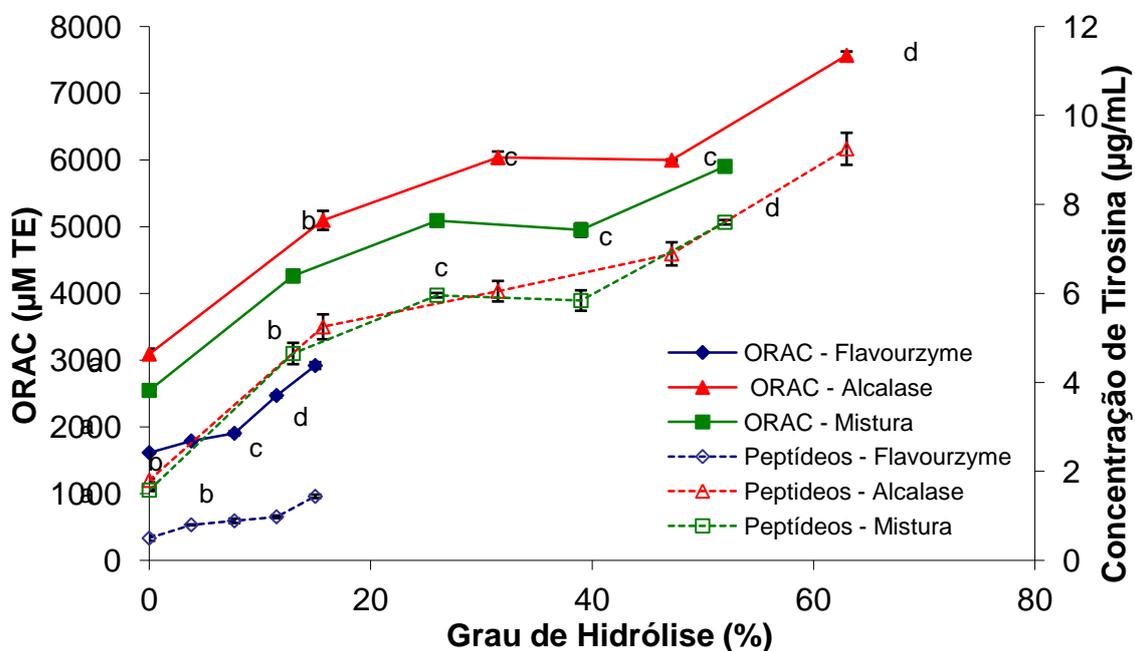
Inicialmente, esperavam-se valores mais expressivos com a mistura enzimática, pois acreditou-se que a ação combinada de enzimas com diferente ação catalítica, endopeptidase e exopeptidase, resultaria em peptídeos de baixa massa molecular e consequentemente maior atividade antioxidante, mas, como mostram os resultados do presente trabalho, esta hipótese não se confirmou. Isso pode estar relacionado à proporção de 50% de Flavourzyme e 50% Alcalase utilizada na reação. Possivelmente, alterando essa proporção seriam obtidos diferentes resultados.

Comparando alíquotas de diferentes condições enzimáticas, mas com valor de GH bem próximos, verificou-se que houve diferença entre Flavourzyme, Alcalase e mistura enzimática. As alíquotas F5, A2 e M2 quando comparadas entre si, apresentaram diferente atividade antioxidante em ambos os métodos avaliados, com diferença estatisticamente significativa entre elas, mesmo tendo valores de GH bem próximos, por volta de 15 %. O mesmo ocorreu entre as alíquotas A3 e M3 com GH por volta de 28 % para o método ORAC. Já, as mesmas alíquotas (A3 e M3), quando analisadas pelo método ABTS não apresentaram diferença estatisticamente significativa quanto à atividade antioxidante. Para as alíquotas A4 e M5 não houve diferença significativa para o método ORAC, já para o método ABTS apresentaram diferença. O GH dessas últimas alíquotas foi cerca de 50 %. Mesmo tendo um GH parecido as alíquotas de diferentes enzimas apresentaram diferentes valores de atividade antioxidante, devido à diferença entre os perfis peptídicos formados em cada condição por causa dos diferentes mecanismos de reação de cada enzima.

A possível justificativa para que não haja correspondência entre a elevada concentração de peptídeos e aumento da atividade antioxidante das alíquotas dos hidrolisados de cada enzima está nas diferentes sequências de aminoácidos formadas, o que segundo a literatura exerce grande influência na atividade antioxidante, na formação de peptídeos com diversas massas moleculares, na presença de diferentes grupos iônicos ou aminoácidos aromáticos, o que consequentemente contribui para os diferentes valores de atividade antioxidante (ARCAN, YEMENICIOGLU, 2007; SARMADI e ISMAIL, 2010; CONTRERAS et al., 2011).



**Figura 21** – Gráfico da atividade antioxidante pelo método ABTS de acordo com a concentração estimada de peptídeos com base na concentração de tirosina das diferentes alíquotas com diferentes graus de hidrólise para as diferentes enzimas.



**Figura 22** - Gráfico da atividade antioxidante pelo método ORAC de acordo com a concentração estimada de peptídeos com base na concentração de tirosina das diferentes alíquotas com diferentes graus de hidrólise para as diferentes enzimas.

Nas Figuras 21 e 22, nota-se um comportamento na alíquota inicial de cada tratamento, correspondente à amostra controle, coletada antes da adição da enzima, portanto, com GH de 0 %, com diferentes valores de atividade antioxidante. Isto pode ser atribuído aos erros inerentes à própria análise de atividade antioxidante, ao tempo que a amostra ficou armazenada até o momento da análise, e também devido aos desvios no ensaio experimental da hidrólise.

As alíquotas controle apresentam menor valor de atividade antioxidante quando comparadas às alíquotas coletadas posteriormente, de proteínas hidrolisadas com diferentes valores de GH. Este resultado é semelhante ao obtido em outros estudos com hidrólise do soro de leite bovino (PENG et al., 2010; SALAMI et al., 2010, CONTRERAS et al., 2011), onde os autores afirmam que apesar da fração proteica intacta apresentar atividade antioxidante este efeito é potencializado após hidrólise enzimática. Segundo Peng et al. (2010) a atividade antioxidante do hidrolisado proteico do soro de leite é atribuída à capacidade de atuar como doador de hidrogênio, quelante de íons metálicos e estabilizante de radicais livres que causam oxidação lipídica. Dessa forma estes hidrolisados possuem potencial de utilização pela indústria alimentícia como antioxidantes naturais.

A comparação dos resultados do presente trabalho com outros valores de capacidade antioxidante de hidrolisados protéicos reportados na literatura foi difícil, pois estes diferem em valores, formas de cálculo e formas de expressar os resultados. Os valores aqui foram expressos em  $\mu\text{M}$  de Trolox equivalente pelo volume de amostra aplicada, mas, ainda assim, foram reportados alguns resultados da literatura com diferentes fontes proteicas a título de comparação.

A diferença de valores de atividade antioxidante obtidos com cada método utilizado neste trabalho se deve às diferenças em seus mecanismos de reação, onde o método ORAC é baseado na transferência de átomos de hidrogênio e o método ABTS baseado na transferência de elétrons (SARMADI, ISMAIL, 2010). Zulueta, Esteve e Frígola (2009), comparando os métodos ORAC e ABTS na quantificação de atividade antioxidante, obtiveram valores para leite desnatado de 20867  $\mu\text{M}$  TE (ORAC) e 2649  $\mu\text{M}$  TE (ABTS), enquanto a capacidade antioxidante obtida com suco de laranja foi de 10897  $\mu\text{M}$  TE (ORAC) e 4875  $\mu\text{M}$  TE (ABTS). Assim, avaliando uma bebida contendo diferentes proporções de suco de laranja e leite, observaram que quando a proporção de leite na bebida era aumentada isso não se refletia em aumento da capacidade antioxidante do produto final quando avaliada pelo método ABTS, demonstrando que este último subestima a capacidade antioxidante dos componentes do leite. Segundo os mesmos autores, comportamento inverso foi obtido com o método ORAC.

Hernández-Ledesma et al. (2005), verificaram que certos grupamentos químicos dos aminoácidos presentes no leite como triptofano e tirosina, aminoácidos aromáticos, tem a habilidade de agir como doadores de hidrogênio. Este mecanismo é responsável pela capacidade antioxidante desses aminoácidos, justificando assim o fato do ORAC, método cujo mecanismo é transferência de átomos de hidrogênio, representar melhor os resultados obtidos com soro de leite. Segundo os autores, seria necessário aumentar o tempo de incubação da reação com ABTS para avaliar a real contribuição dos componentes do leite na atividade antioxidante, diferente do suco de laranja, rico em ácido ascórbico, que reage mais rapidamente com este último radical.

Outros resultados obtidos com matéria-prima de origem vegetal rica em proteína como feijão (*Phaseolus vulgaris* L. variedade Jamapa) e soja, hidrolisados através da combinação das enzimas pepsina e pancreatina (CARRASCO-CASTILLA et al., 2012; RANAMUKHAARACHCHI, MEISSNER E MORESOLI, 2013) apontaram valores de 933,61 e 999,33  $\mu\text{M}$  TE/mg de proteína para frações peptídicas purificadas (menores que 1

kDa) de hidrolisados de feijão pelo método ABTS e, para hidrolisados de isolado proteico de soja, valores entre 904 e 5562  $\mu\text{M TE/g}$  proteína, com peptídeos acima de 10 kDa e menores que 2,5 kDa respectivamente pelo método ORAC.

Girgih et al. (2013) avaliando hidrolisado de músculo de salmão, hidrolisado pela combinação das enzimas tripsina, pepsina e quimotripsina, obtiveram valores de atividade antioxidante pelo método ORAC variando entre 1315 e 1541  $\mu\text{M TE /g}$  de proteína para quatro frações peptídicas purificadas através de cromatografia líquida e 819,3  $\mu\text{M TE /g}$  para a fração total de peptídeos.

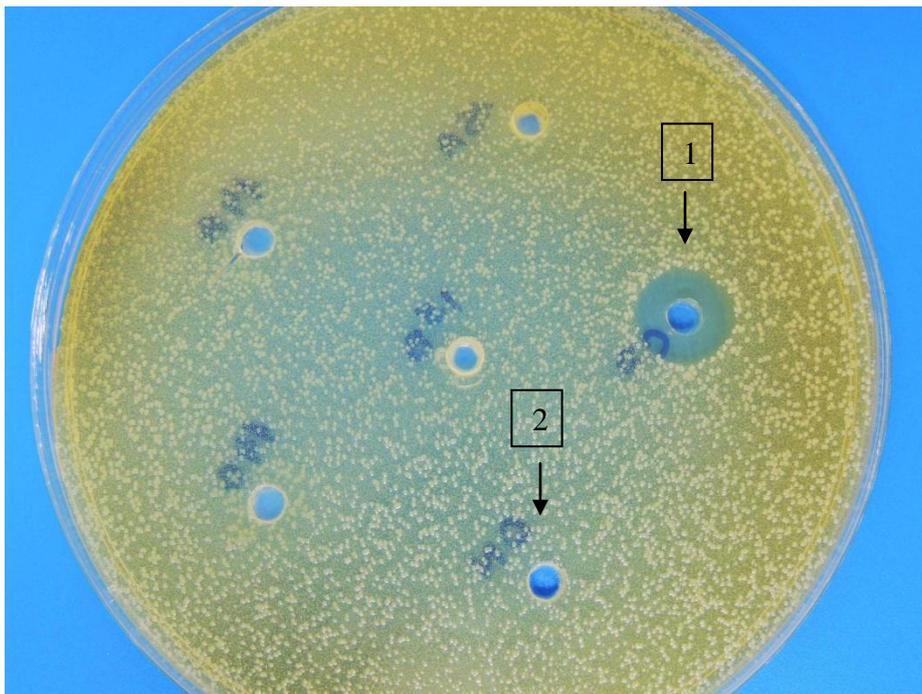
A comparação de resultados deve levar em consideração a diferença entre o método, a natureza e origem das matrizes alimentícias analisadas, assim como o tipo de enzima e o perfil peptídico do hidrolisado, pois estes influenciam sobremaneira na cinética de inibição dos diferentes radicais livres. Segundo Samardi e Ismail (2010) embora existam diversos métodos de avaliação da atividade antioxidante em matrizes alimentícias, nenhum deles pode ser classificado como método padrão oficial, sugerindo a necessidade de realizar essa avaliação a partir de vários métodos, que usam diferentes condições e mecanismos de reação para uma avaliação mais acurada.

#### 5.4 Atividade Antimicrobiana

Na avaliação da atividade antimicrobiana, não se verificou atividade dos hidrolisados obtidos contra as cepas bacterianas estudadas, no entanto, não significa dizer que os hidrolisados proteicos do soro de leite não possam apresentar essas propriedades. Apenas podemos afirmar que as espécies *Salmonella choleraesuis subsp. Enteritidis CT* (ATCC 13076) e *Listeria monocytogenes*, (ATCC 9117) não foram susceptíveis à ação dos peptídeos obtidos neste trabalho.

Não foi possível a realização da caracterização dos peptídeos formados neste estudo, porém, segundo Demers-Mathieu et al. (2013), os hidrolisados do soro obtidos pela hidrólise com tripsina formam em maior proporção peptídeos negativamente carregados, não tendo ação efetiva contra bactérias gram-negativas, que possuem na superfície da membrana celular lipopolissacarídeos também carregados negativamente, repelindo assim os peptídeos aniônicos. Os mecanismos de ação dos peptídeos antimicrobianos derivados de produtos lácteos ainda não foram definidos, em parte por conta da diversidade na composição de aminoácidos e características físico-químicas, como estrutura da molécula, carga líquida, ponto isoelétrico, massa molecular e caráter anfipático destes.

Na Figura 23, pode-se observar claramente que apenas o controle positivo, solução de clorexidina a 0,12 %, apresentou atividade antimicrobiana, o que pode ser visualizado pela formação de halo de inibição do crescimento microbiano ao redor de seu poço de aplicação. Todas as amostras de hidrolisado exibiram o mesmo comportamento contra as bactérias analisadas, não formando halo de inibição, portanto optou-se por mostrar apenas um resultado como exemplo.



**Figura 23** – Placa contendo meio de cultura bacteriano. Controle positivo (1), controle negativo (2) e demais poços com amostras de hidrolisado proteico de soro de leite.

Também deve-se levar em consideração que, diferentemente do presente trabalho, diversos estudos são realizados a partir de frações purificadas, obtidas a partir de tecnologias como a cromatografia ou mesmo frações peptídicas concentradas por processos utilizando membranas, o que pode potencializar a ação desses compostos. Dessa forma, uma possível explicação para que os hidrolisados obtidos neste trabalho não apresentassem atividade antimicrobiana pode ser a baixa concentração final de peptídeos e o perfil peptídico presente em cada alíquota dos hidrolisados. No presente trabalho, a concentração de peptídeos obtida com as alíquotas dos hidrolisados liofilizados e solubilizados na proporção de 1 g de hidrolisado para 5 mL de tampão pode ser visualizada na Tabela 6.

De acordo com Salami et al. (2010), para adequada atividade antimicrobiana é necessário que na cadeia polipeptídica haja uma sequência entre 2 e 20 resíduos de aminoácidos e os peptídeos de tamanhos menores apresentam maior efetividade na atividade antimicrobiana, pois possuem maior facilidade em se ligar aos lipídeos presentes na membrana celular das bactérias.

**Tabela 6** – Concentração de peptídeos nas alíquotas de hidrolisados utilizados na avaliação da atividade antimicrobiana.

Alíquota	Teor de peptídeos (mg/mL)
F1	0,04
F2	0,04
F3	0,04
F4	0,04
F5	0,04
A1	0,07
A2	0,18
A3	0,22
A4	0,25
A5	0,32
M1	0,07
M2	0,16
M3	0,22
M4	0,22
M5	0,25

Onde: (F) corresponde às alíquotas da hidrólise com a enzima Flavourzyme, (A) Alcalase e (M) mistura enzimática.

Demers-Mathieu et al. (2013) avaliaram a atividade antimicrobiana de peptídeos aniônicos, oriundos de isolado proteico de soro hidrolisado com tripsina e concentrado por nanofiltração. Como resultado, o hidrolisado protéico, na concentração de 20 mg/ mL<sup>-1</sup>, apresentou inibição do crescimento de *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*, bactérias gram-positivas, e com menor efetividade contra *Escherichia coli*, de natureza gram-negativa.

Diferentemente, Salami et al. (2010) avaliaram atividade antimicrobiana de hidrolisados proteicos de soro de leite bovino e soro de leite de camelídeos, usando diferentes enzimas, obtendo ação desses peptídeos contra *Escherichia coli*, tendo maior efetividade o hidrolisado de camelídeos devido à diferença no perfil peptídico. O soro de camelídeos é rico em lisozima e não contém a fração  $\beta$ -lactoglobulina em sua composição, diferente do soro bovino, no qual 80 % de sua fração proteica corresponde a esta proteína, contribuindo para diferença no perfil peptídico final entre as duas matrizes. A hidrólise enzimática é conhecida por incrementar propriedades intrínsecas das proteínas, e a fração proteica  $\beta$ -lactoglobulina é também conhecida por ser mais resistente a esse processo, o que explica a menor atividade antimicrobiana atribuída ao hidrolisado de soro bovino segundo os autores.

## 6 CONCLUSÕES

O concentrado proteico de soro de leite em pó reconstituído, ao ser submetido ao processo de ultrafiltração em diferentes temperaturas, apresentou um decréscimo inicial no fluxo de permeado, comum em todas as temperaturas testadas nos primeiros 20 minutos de processo, até estabilização. O resultado mais eficiente foi obtido à temperatura de 40 °C, onde o fluxo de permeado atingiu 51,4 kg/hm<sup>2</sup> com tempo total de processo de 50 minutos. Maior fluxo de permeado e menor tempo de processo foram alcançados utilizando temperatura de 50 °C, porém, isso não refletiu em maior massa proteica na fração concentrada pela membrana, além de acarretar um maior gasto energético e possíveis condições de desnaturação proteica, justificando a escolha de 40 °C como condição ideal.

As curvas de cinética de hidrólise do concentrado proteico de soro de leite sob diferentes condições de reação, apresentaram alta taxa de hidrólise inicial, seguida da redução na taxa de hidrólise, tendendo à estabilização final, por volta dos 360 minutos de reação. Os valores de GH alcançados neste experimento foram de 15 %, 52 % e 63 % para Flavourzyme, mistura enzimática e Alcalase, respectivamente. O maior grau de hidrólise alcançado com Alcalase, uma endopeptidase, e o menor grau de hidrólise com Flavourzyme, uma exopeptidase, se deve a diferença na ação catalítica de ambas enzimas, as quais possuem sítios de ligação específicos na cadeia polipeptídica, atuando em diferentes pontos da estrutura proteica para clivagem das ligações peptídicas. Dessa forma há possibilidade de obtenção de hidrolisados com diferentes perfis peptídicos e diferentes propriedades, podendo estes ter diversas destinações na indústria alimentícia e possivelmente na indústria farmacêutica.

Os valores de atividade antioxidante obtidos com as alíquotas das diferentes enzimas, nos diferentes métodos de quantificação utilizados neste trabalho, apontaram menores valores para a enzima Flavourzyme, seguidos dos hidrolisados da mistura enzimática e por último, com maior efetividade neste quesito, os hidrolisados da Alcalase. Isso corrobora dados da literatura que reportam maiores valores de atividade antioxidante aos peptídeos de menor massa molecular, obtidos neste trabalho pela reação com a Alcalase. As diferenças encontradas se devem à diferente ação catalítica de cada enzima, formando diferentes perfis peptídicos.

Os hidrolisados obtidos neste trabalho não apresentaram atividade antimicrobiana contra cepas de *Salmonella choleraesuis subsp. Enteritidis CT* (ATCC 13076) e *Listeria monocytogenes*, (ATCC 9117), possivelmente pela baixa concentração final de peptídeos nas alíquotas analisadas e também por conta do perfil peptídico formado.

## 7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

O estudo realizado neste trabalho avaliou apenas as etapas iniciais de obtenção de hidrolisados proteicos e influência do grau de hidrólise na atividade antimicrobiana e antioxidante. Como o perfil peptídico influencia as características finais do produto, algumas sugestões para trabalhos futuros são feitas a fim de explicar mais detalhadamente a influência deste nas propriedades funcionais e nutricionais atribuídas aos peptídeos oriundos da hidrólise enzimática das proteínas do soro de leite.

- a) Estudar propriedades térmicas (DSC) das proteínas do soro para avaliar temperatura de desnaturação antes do processamento por membranas;
- b) Avaliar o uso de outras enzimas proteolíticas na obtenção de hidrolisados do soro de leite;
- c) Avaliar o perfil peptídico dos hidrolisados obtidos através de cromatografia líquida de alta eficiência e sua influência na atividade antioxidante e antimicrobiana;
- d) Realizar o processo de hidrólise em escala piloto com posterior fracionamento dos peptídeos gerados em diferentes faixas de peso molecular por processo com membranas e avaliar suas propriedades;
- e) Realizar testes “in vivo” com os hidrolisados produzidos para verificar o efeito dos mesmos no organismo;
- f) Estudar a viabilidade da utilização e aplicabilidade dos hidrolisados como ingrediente na formulação de algum alimento;
- g) Avaliação de frações peptídicas purificadas e seu efeito na atividade antimicrobiana contra diferentes cepas de microrganismos importantes em alimentos;
- h) Avaliar o uso de diferentes membranas na separação e concentração de componentes do soro;
- i) Realizar análise de sulfidrilas livres no hidrolisado para avaliar hidrólise e contribuição de aminoácidos sulfurados na atividade antioxidante ou antimicrobiana.

## 8 REFERÊNCIAS

ADLER-NISSEN, J. **Enzymic hydrolysis of food protein**. London: Elsevier Applied Science Publishers, 1986.

AFONSO, W.O. **Obtenção de hidrolisados enzimáticos do concentrado protéico do soro de leite com elevado teor de di-tripeptídeos para utilização em nutrição clínica**. 2008. 89 p. Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciência de Alimentos, Belo Horizonte.

AGYEI, D., DANQUAH, M.K. Rethinking food-derived bioactive peptides for antimicrobial and immunomodulatory activities. **Trends in Food Science & Technology**, v.23, p. 62-69, 2012.

ANTUNES, A.J. **Funcionalidade de proteínas do soro de leite bovino**. Editora Manole, 2003, São Paulo, Barueri, 135p.

ARCAN, I., YEMENICIOGLU, A. Antioxidant activity of protein extracts from heat-treated or thermally processed chickpeas and white beans. **Food Chemistry**, n. 103, p. 301-312, 2007.

ATRA, R., VATAI, G., BEKASSY-MOLNAR, E., BALINT, A. Investigation of ultra- and nanofiltration for utilization of whey protein and lactose. **Journal of Food Engineering** n. 67, p. 325–332, 2005.

BALDASSO, C. **Concentração, purificação e fracionamento das proteínas do soro lácteo através da tecnologia de separação por membranas**. 2008. 179p. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial à obtenção do grau de mestre em Engenharia, Porto Alegre.

BALDISSERA, A.C. BETTA, F.D., PENNA, A..L.B., LINDNER, D.D.J. Alimentos funcionais: uma nova fronteira para o desenvolvimento de bebidas protéicas a base de soro de leite. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 4, p. 1497-1512, 2011.

BELMEJDOUB, J., RABILLER-BAUDRY, M., DELAUNAY, D., GÉSAN-GUIZIOU, G. Structural modifications of globular proteins in a ultrafiltration loop as evidenced by intrinsic fluorescence and reverse-phase liquid chromatography. **Separation and Purification Technology**, v.96, p. 274-288, 2012.

BENÍTEZ, R., IBARZ, A., PAGAN, J., Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. **Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana**, v.42, n.2, p. 227-236, 2008.

BIASUTTI, E.A.R., **Otimização das condições da hidrólise enzimática das proteínas do soro de leite para obter elevado teor de oligopeptídeos: utilização da subtilisina e da pancreatina**. 2006. 88 p. Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em

Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciência de Alimentos, Belo Horizonte.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. **Anal. Biochem.** v.72, p.248-254, 1976.

BRESCIANI, D., GUIMARÃES, D. H., SANTOS, D. K. M., BRIOUDE, M. M., PRADO, L. A. S. A., JOSÉ, N. M. Preparação e caracterização de membranas poliméricas para dessalinização de água. **Anais do 10º Congresso Brasileiro de Polímeros**, Foz do Iguaçu, 2009.

CÂNDIDO, L.M.B. **Obtenção de concentrados e hidrolisados proteicos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*): composição, propriedades nutritivas e funcionais.** 1998. 227 p. Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor. Campinas.

CAMARGO, D. S., ALVES, G., GARCIA, S., MIZUBUTI, I. Y. **Bebida fermentada à base de soro de leite e isolado protéico de soja.** *Semina: Ci. Agrárias*, Londrina, v.21, n. 1. p. 45-51, mar. 2000.

CARIC, M.D., MILANOVIC, S.D., KRSTIC, D.M., TEKIC, M.N. Fouling of inorganic membranes by adsorption of whey proteins. **Journal of Membrane Science**, v. 165 p. 83–88, 2000.

CARLOS, M.R.E., **Avaliação das propriedades funcionais de hidrolisados de proteínas do soro de leite.** 1997. 97 p. Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de mestre em Tecnologia de Alimentos, Campinas.

CARRASO-CASTILLA, J. HERNÁNDEZ-ÁLVAREZ, A.J., JIMÉNEZ-MARTÍNEZ, C., JACINTO-HERNÁNDEZ, C., ALAIZ, M., GIRÓN-CALLE, J., VIOQUE, J., DÁVILA-ORTIZ, G. Antioxidant and metal chelating activities of peptide fractions from phaseolin and bean protein hydrolysates. **Food chemistry**, v.135, p.1789-1795, 2012.

CASTRO, B.N., GERLA, P.E. Hollow fiber and spiral cheese whey ultrafiltration: minimizing controlling resistances. **Journal of Food Engineering**, v. 69 p. 495–502, 2005.

CHANG-LEE, M.V., PACHECO-AGUILAR, R., CRAWFORD, D.L., LAMPILA, L.E. Proteolytic activity of surimi from Pacific Whiting (*Merluccius productus*) and heat-set gel texture. *Journal of food science*, v. 54, n. 5, p. 1116-1119, 1989.

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

DEBON, J., **Emprego da microfiltração tangencial na obtenção de leite fermentado prebiótico**. 2009. 120 p. Dissertação apresentada ao curso de pós-graduação em Engenharia de Alimentos do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos, Florianópolis.

DEMERS-MATHIEU, V., GAUTHIER, S.F., BRITTEN, M., FLISS, I., ROBITAILLE, G., JEAN, J. Antibacterial activity of peptides extracted from tryptic hydrolyzate of whey protein by nanofiltration. **International Dairy Journal**, v.28, p. 94-101, 2013.

D'SOUZA, N. M., MAWSON, A. J. Membrane cleaning in the dairy industry: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 45, p. 125–134, 2005.

ELIAS, R. J., KELLERBY, S.S., DECKER, E. A. Antioxidant activity of proteins and peptides. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.48, n.5, p.430-441, 2008.

ELIAS, R.J., MCCLEMENTS, D.J., DECKER, E.A. Antioxidant Activity of Cysteine, Tryptophan, and Methionine Residues in Continuous Phase  $\beta$ -Lactoglobulin in Oil-in-Water Emulsions. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 53, p. 10248-10253, 2005.

EMBRAPA CNPGL, **Estatísticas do leite - Principais países produtores de leite no mundo– 2009**. Embrapa Gado de Leite. Disponível em: < <http://www.cnppl.embrapa.br/>> Acesso em: 22/07/2011.

EPO, European Patent Office. Banco de patentes. Disponível em: <[http://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/biblio?DB=worldwide.espacenet.com&II=26&ND=3&adjacent=true&locale=en\\_EP&FT=D&date=19861211&CC=DE&NR=3518828A1&KC=A1](http://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/biblio?DB=worldwide.espacenet.com&II=26&ND=3&adjacent=true&locale=en_EP&FT=D&date=19861211&CC=DE&NR=3518828A1&KC=A1)> Acesso em: 30/05/2013.

FELLOWS P. J. **Tecnologia do processamento de alimentos: princípios e prática**. 2. ed. Editora Artmed, 2006, Porto Alegre, p. 159-172.

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

FIGUEIRÊDO, M.C.B., TEIXEIRA, A.S., ARAÚJO, L.F.P., ROSA, M.F., PAULINO, W.D., MOTA, S., ARAÚJO, J.C. Avaliação da vulnerabilidade ambiental de reservatórios à eutrofização. **Engenharia Sanitária Ambiental**, v. 12, n. 4, p. 399-409, 2007.

GAVA, A. J., SILVA, C. A. B., FRIAS, J. R. G., **Tecnologia de alimentos. Princípios e aplicações**. Editora Nobel, 2008, São Paulo, p. 305- 464.

GERDES, S K., HARPER, W. J., MILLER, G. **Componentes bioativos de soro e a saúde cardiovascular**. Monografia Aplicações saúde cardiovascular, USA. USDEC, U.S. Dairy Export Council, 1999.

GIRARD, B., FUKUMOTO, L. R.. Membrane processing of fruit juices and beverages: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 40, n. 2, p. 91-157, 2000.

GIRGIH, A.T., UDENIGWE, C.C., HASAN, F.M., GILL, T.A., ALUKO, R.E. Antioxidant properties of Salmon (*Salmo salar*) protein hydrolysate and peptide fractions isolated by reverse-phase HPLC. **Food research international**, doi: 10.1016/j.foodres.2013.03.034, 2013.

GONZÁLEZ, F. H. D., DÜRR, J. W., FONTANELI, R. S., **Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras**. Publicação da biblioteca setorial da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2001, 72p.

GUADIX, A.; GUADIX, E.M.; PÁEZ-DUEÑAS, M.P.; GONZÁLEZ-TELLO, P.; CAMACHO, F. **Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas**. *Ars Pharmaceutica*, v.41, n.1, p. 79-89, 2000.

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.

HARAGUCHI, F. K., ABREU, W.C., DE PAULA, H., **Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana**. *Rev. Nutr.* n.19 v. 4 p. 479-488, jul/ago 2006.

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B., DÁVALOS, A., BARTOLOMÉ, B., AMIGO, L. Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1841–1856, 2005.

HUANG, D., OU, B., PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1841-1856, 2005.

IMM, J.Y., LEE, C.M. Production of seafood flavor from Red Hake (*Urophycis chuss*) by enzymatic hydrolysis. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 47, p. 2360-2366, 1999.

JESUS, D.F., LEITE, M.F., SILVA, L.F.M., MODESTA, R.D., MATTA, V.M., CABRAL, L.M.C. Orange (*Citrus sinensis*) juice concentration by reverse osmosis. **Journal of Food Engineering**, n. 81, p. 287–291, 2007.

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. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 625–631, 2007.

KONRAD, G., KLEINSCHMIDT, T., FABER, W. Ultrafiltration flux of acid whey obtained by lactic acid fermentation. **International Dairy Journal**, v. 22, p. 73-77, 2012.

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

KOUTINAS, A. A., ATHANASIADIS, I., BEKATOROU, A., PSARIANOS, C., KANELLAKI, M., AGOURIDIS, N., BLEKAS, G., **Kefir yeast technology: Industrial scale up of alcoholic fermentation of whey, promoted by raisin extracts, using kefir-yeast granular biomass.** *Enzyme and Microbial Technology* v.41 p. 576-582, 2007.

KOUTINAS, A.A., PAPAPOSTOULOU, H., DIMITRELLOU, D., KOPSAHELIS, N., KATECHAKI, E., BEKATOROU, A., BOSNEA, L.A. **Whey valorisation: A complete and novel technology development for dairy industry starter culture production.** *Bioresource Technology* n.100 p.3734–3739, 2009.

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

KRISTINSSON, H.G.; RASCO, B.A. Kinetics of the hydrolysis of atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins by alkaline proteases and a visceral serine protease mixture. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 36, n. 1, p. 131-139, 2000b.

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

LAKSHMAN, P.L.N, TOYOKAWAA, Y., TACHIBANA, S., TOYAMA, H., TAIRA, T., YASUDA, M. Reducing the antigenicity of milk whey protein using acid proteinases from *Monascus pilosus*. **Process Biochemistry**, n. 46, p. 806–810, 2011.

LI-JUN, L., CHUAN-HE, Z., ZHENG, Z. Analyzing molecular weight distribution of whey protein hydrolysates, **Food and bioproducts processing**, v. 86, p. 1 – 6, 2008.

LIMA, G.A., SANTANA, M. F., SOUZA R. R. Otimização do processo de recuperação e concentração da bromelina utilizando membranas cerâmicas. **Scientia Plena** v. 5, n. 11, p. 114 - 201, 2009.

MACHADO, R.M.G., SILVA, P.C., FREIRE, V.H. **Controle ambiental em indústrias de laticínios.** *Brasil Alimentos* n. 7 p.34-36, mar/abr 2001.

MAGET-DIANA, R. The monolayer technique: a potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with lipid membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1462, p. 109-140, 1999.

MATTA, V.M., MORETTI, R.H., CABRAL, L.M.C. Microfiltration and reverse osmosis for clarification and concentration of acerola juice. **Journal of Food Engineering**, n. 61, p. 477–482, 2004.

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

MIZUBUTI, I.Y., **Soro de leite: composição, processamento e utilização na alimentação.** Semina: Ci. Agr., Londrina, v.15 n.1 p.80-94, março 1994.

MULDER, Marcel. **Basic Principles of Membrane technology.** 2. ed. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 1991.

NAGHMOUCHI, K., KHEADR, K.E., LACROIX, C. FLISS, C.I. Class I/Class IIa bacteriocin cross-resistance phenomenon in *Listeria monocytogenes*. **Food Microbiology**, v. 24, p. 718-727, 2007.

NCHIENZA, H. A., MORAWICKI, R. O., GADANG, V. P. Enzymatic hydrolysis of poultry meal with endo- and exopeptidases. **Poultry Science**, v.89, p.2273–2280, 2010.

ORDÓÑEZ PEREDA, J.A., RODRÍGUEZ, M.I.C., ÁLVAREZ, L.F., SANZ, M.L.G., MINGUILLÓN, G.D.G.F., PERALES, L.H., CORTECERO, M.D.S., **Tecnologia de Alimentos - Componente dos alimentos e processos.** Editora Artmed, 2005, Porto Alegre, p. 270- 280.

PACHECO, M.T.B., DIAS, N.F.G., BALDINI, V.L.S., TANIKAWA, C., SGARBIERI, V.C. **Propriedades funcionais de hidrolisados obtidos a partir de concentrados protéicos de soro de leite.** Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, n. 25 v.2 p.333-338, 2005.

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

PENG, X., KONG, B., XIA, X., LIU, Q. Reducing and radical-scavenging activities of whey protein hydrolysates prepared with Alcalase, **International Dairy Journal**, v. 20, p. 360–365, 2010.

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

PETERS, R. H., Economic aspects of cheese making as influenced by whey processing options. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 537–545, 2005.

PIHLANTO-LEPPÄLÄ, A. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ACE inhibitory peptides. **Trends in Food Science & Technology**, v.11, p. 347-356, 2001.

PORTAL LABORATÓRIOS VIRTUAIS DE PROCESSOS QUÍMICOS. 2007. **Processos químicos. Processos biológicos. Processos de separação. Membranas.** Disponível em:<[http://labvirtual.eq.uc.pt/siteJoomla/index.php?Itemid=206&id=57&option=com\\_content&task=view#4](http://labvirtual.eq.uc.pt/siteJoomla/index.php?Itemid=206&id=57&option=com_content&task=view#4)> Acesso em: 22/02/2012.

POULIOT, Y. Membrane processes in dairy technology - From a simple idea to worldwide panacea. **International Dairy Journal**, n. 18, p. 735–740, 2008.

RANAMUKHAARACHCHI, S., MEISSNER, L., MORESOLI, C. Production of antioxidant soy proteins hydrolysates by sequential ultrafiltration and nanofiltration. **Journal of membrane science**, v. 429, p. 81-87, 2013.

RE, R., PELLEGRINI, N., PROTEGGENTE, A., PANNALA, A., YANG, M. AND 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.

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

RIBEIRO, A.P.B., SOARES, M.S., MOURA, J.M.L.N., CÁCERES, M.C., GONÇALVES, L.A.G. Aplicações da tecnologia de membranas no processamento de óleos vegetais. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 23, n. 1, 2005.

RUAS, G. W. **Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de lisozimas**. 2010. 81p. Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para obtenção do grau de mestre em Fármaco e Medicamentos, São Paulo.

SABOYA, L.V., MAUBOIS, J.L. Current developments of microfiltration technology in the dairy industry. **Lait**, v.80, p.541-553, 2000.

SALAMI, M., MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A., EHSANI, M. R., YOUSEFI, R., HAERTLE, T., CHOBERT, J. M., RAZAVI, S. H., HENRICH, R., BALALAE, S., EBADI, S. A., POURTAKDOOST, S., NIASARI-NASLAJI, A. Improvement of the antimicrobial and antioxidant activities of camel and bovine whey proteins by limited proteolysis. **J. Agric. Food Chem.**, v. 58, n. 6, p.3297 – 3302, 2010.

SANTOS, M. V., OLIVEIRA, C. A. F., LIMA, Y. V. R., BOTARO, B. G. Remoção de células somáticas pela microfiltração não afeta a composição e a proteólise do leite. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.5, p.1486-1493, set-out, 2006.

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

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

SCHÄGGER, H., Tricine SDS-PAGE. **Nature Protocols**, v. 1, n. 1, p. 16-22, 2006.

SGARBIERI, V. C., **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações**. Livraria Varela, 1996, São Paulo, 517 p.

SGARBIERI, V.C., Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Rev. Nutr.**, Campinas, n.17 v.4 p.397-409, out./dez., 2004.

SINHA, R., RADHA, C., PRAKASH, J., KAUL, P. Whey protein hydrolysate: Functional properties, nutritional quality and utilization in beverage formulation. **Food Chemistry**, n.101 p. 1484–1491, 2007.

SPELLMAN, D., McEVOY, E., O'CUINN, G., FITZGERALD, R.J., Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis. **International Dairy Journal** v.13, p.447–453, 2003.

SVENNING, C., MOLLAND, T., LANGSRUD, T., VEGARUD, G.E. A characterization study of peptides derived from casein proteolysis. In: IDF (International Dairy Federation) **Sem. Protein Fat glob. Mod.**, p. 96 – 106, 1993.

SYMONS, M. C. R., GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals and iron: Chemistry, biology, and medicine.** Oxford; New York, Oxford University Press, 1998.

TARDIOLI, P. W. **Hidrólise controlada de proteínas do soro de queijo usando carboxipeptidase A e alcalase ® imobilizadas multipontualmente em agarose.** 2003. 173p. Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos como requisito para obtenção do grau de doutor em Engenharia Química, São Carlos.

WALZEM, R. L. **Propriedades benéficas à saúde das proteínas de soro e frações de soro.** 1999. Monografia Produtos e bebidas nutricionais. Texas A & M University, USA. USDEC U.S. Dairy Export Council.

WAN, J.; WILCOCK, A.; COVENTRY, M.J. The effect of essential oils of basil on the growth of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, p. 152-158, 1998.

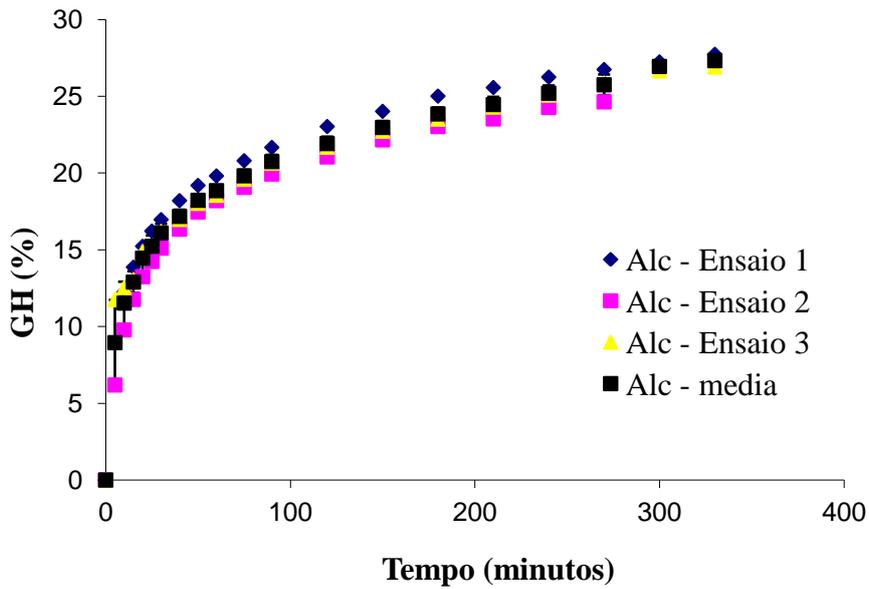
WIT, J.N. Nutritional and Functional Characteristics of Whey Proteins in Food Products. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 3, 1998.

ZULUETA, A.; ESTEVE, M. J. & FRÍGOLA, A. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity for food products. **Food Chemistry**, v. 114, p. 310-316, 2009.

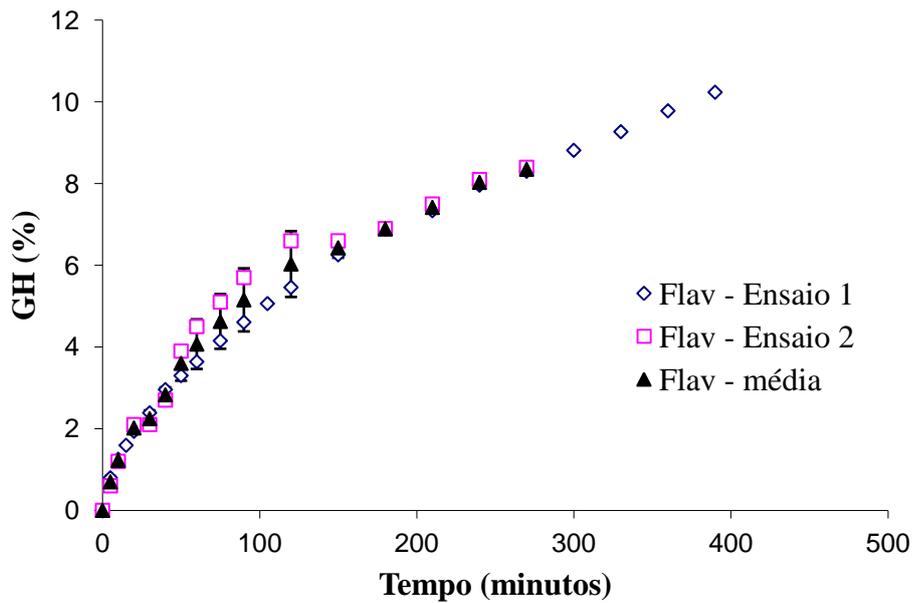
## ANEXOS

### Anexo A

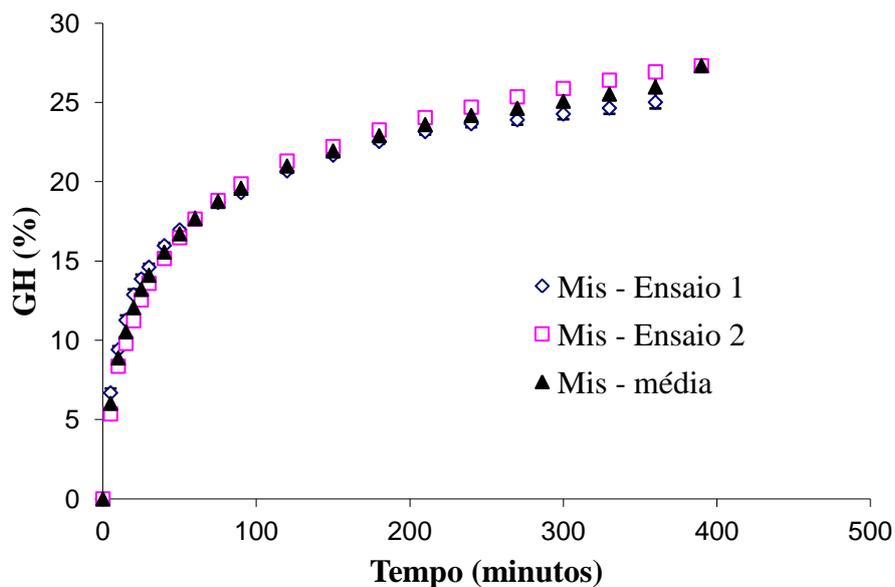
Gráficos dos testes preliminares da reação de hidrólise enzimática nas três diferentes condições enzimáticas utilizando o CPS reconstituído com 5 % de proteína e nas mesmas condições de reação descritas na Tabela 4 (Figuras 22, 23 e 24).



**Figura 24** – Diferentes replicatas das curvas de cinética de hidrólise enzimática das proteínas do soro de leite com a enzima Alcalase.



**Figura 25** – Diferentes replicatas das curvas de cinética de hidrólise enzimática das proteínas do soro de leite com a enzima Flavourzyme.



**Figura 26** - Diferentes replicatas das curvas de cinética de hidrólise enzimática das proteínas do soro de leite com a mistura enzimática.

Nos testes realizados foram obtidos resultados de 26 % de GH com desvio padrão entre 0,04 a 1,3 para Alcalase; 8,3 % GH e desvio padrão entre 0,01 a 0,13 para Flavourzyme e 27% de GH para a mistura enzimática com desvio padrão entre 0,21 a 2,7 para a mistura enzimática, demonstrando a boa repetibilidade das curvas de cinética.