

## Potencial antioxidante de hidrolisados proteicos obtidos a partir de caseinato de ruminantes pela ação de proteases comerciais

### *Potential antioxidant of protein hydrolysates obtained from ruminant caseinate by the action of commercial proteases*

Wellington Leal dos Santos<sup>1</sup>, Maria do Bom Conselho Lacerda Medeiros<sup>2</sup>, Edson Flávio Teixeira da Silva<sup>1</sup>, João Tiago Correia de Oliveira<sup>3</sup>, Keila Aparecida Moreira<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>Doutorando em Biociência Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco; <sup>2</sup>Doutoranda em Agronomia, Universidade Federal Rural da Amazônia; <sup>3</sup>Professor Adjunto, Universidade Federal do Agreste de Pernambuco;

<sup>4</sup> Professora Titular, Universidade Federal do Agreste de Pernambuco

#### Resumo

**Introdução:** a oxidação em sistemas biológicos está relacionada ao desenvolvimento de patologias em humanos. A ingestão de alimentos ricos em compostos químicos que exercem atividade antioxidante contribui para a prevenção e redução dos efeitos deletérios dos radicais livres formados no organismo. Peptídeos derivados das caseínas têm mostrado um elevado potencial como agentes antioxidantes. **Objetivos:** neste sentido, o presente estudo avaliou a atividade antioxidante de hidrolisados derivados de caseínas de leites das espécies bubalina, bovina e caprina, obtidos pela ação de diferentes proteases. **Metodologia:** inicialmente, as caseínas foram isoladas dos demais componentes do leite, depois foram submetidas ao processo de proteólise pelas enzimas bromelina, papaína, tripsina e neutrase, individualmente. A atividade antioxidante dos hidrolisados foi avaliada, através da capacidade de eliminação dos radicais: hidroxila ( $\text{OH}^\cdot$ ), superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), 2,2 difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), 2,2'azinobis-(3-ácido etilbenzotiazolino-6-sulfônico (ABTS)), e quelante dos íons metálicos cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) e ferro ( $\text{Fe}^{2+}$ ). **Resultados:** os resultados mostraram que a caseína bovina apresentou o menor (35,54%) grau de hidrólise e a caseína bubalina apresentou o maior (85,64%) grau de hidrólise pela ação da neutrase e bromelina após 480 minutos, respectivamente. O potencial para o sequestro dos radicais hidroxila variou entre 0 e 100%, superóxido superior a 80%, ABTS superior a 85%, DPPH entre 20 e 95% habilidade de quelar ferro entre 10 e 100% e cobre entre 14 e 80%. **Conclusão:** assim, a hidrólise das caseínas do leite bubalino, bovino e caprino foram capazes de produzir hidrolisados com elevado potencial antioxidante e que, mediante novos estudos, poderá vir ser incorporado em produtos alimentícios para o consumo humano.

**Palavras-Chaves:** *Bubalus bubalis* L. *Capra aegagrus hircus*. *Bos taurus*. Nutraceutico. Peptídeos bioativos.

#### Abstract

**Introduction:** oxidation in biological systems is related to the development of pathologies in humans. The ingestion of foods rich in chemical compounds that exert antioxidant activity contributes to the prevention and reduction of the deleterious effects of free radicals formed in the body. Peptides derived from caseins have shown high potential as antioxidant agents. **Objectives:** the present study evaluated the antioxidant activity of casein hydrolysates derived from bubaline, bovine, and caprine milk obtained by the action of different proteases. **Methodology:** initially, the caseins were isolated from the other milk components, and then subjected to the proteolysis process by the enzymes bromelain, papain, trypsin and neutrase, individually. The antioxidant activity of the hydrolysates was evaluated, through the capacity of elimination of the radicals: hydroxyl ( $\text{OH}^\cdot$ ), superoxide ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), 2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'azinobis-(3-ethylbenzothiazolino-6-sulfonic acid (ABTS)), and chelating of the metal ions copper ( $\text{Cu}^{2+}$ ) and iron ( $\text{Fe}^{2+}$ ). **Results:** the results showed that bovine casein showed the lowest (35.54%) degree of hydrolysis and bubaline casein showed the highest (85.64%) degree of hydrolysis by the action of neutrase and bromelain after 480 minutes, respectively. The potential for hydroxyl radical sequestration varied between 0 and 100%, superoxide higher than 80%, ABTS higher than 85%, DPPH between 20 and 95% and the ability to chelate iron between 10 and 100% and copper between 14 and 80%. **Conclusion:** thus, the hydrolysis of caseins from bubaline, bovine and goat milk were able to produce hydrolysates with high antioxidant potential and that, upon further studies, may be incorporated into food products for human consumption.

**Keywords:** *Bubalus bubalis* L. *Capra aegagrus hircus*. *Bos taurus*. Nutraceutical. Bioactive peptides.

#### INTRODUÇÃO

Os processos relacionados à oxidação podem originar diversos distúrbios patogênicos e induzir a instalação de doenças de caráter crônico que estão correlacionadas aos altos níveis de estresse oxidativo. Tal fato pode acar-

retar em dano celular, devido ao desequilíbrio entre o sistema de defesa antioxidante e o acúmulo de radicais livres (BARBOSA *et al.*, 2010). Estes, por sua vez, podem interagir quimicamente com proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos. Neste último, desencadeando o processo de peroxidação lipídica, enfraquecimento do sistema de defesa (antioxidante) e do sistema enzimático, o que aumenta o risco de ocorrência de diversas doenças em humanos (KEPEKCI *et al.*, 2013).

**Correspondente/Corresponding:** \*Keila Aparecida Moreira – End: Avenida Bom Pastor, S/N - Boa Vista - Garanhuns - PE CEP: 55292-272 – Tel: (87) 3764-5581 – E-mail: keila.moreira@ufape.edu.br

Peptídeos derivados de certas proteínas alimentares apresentam propriedades biológicas específicas, tornando-os potenciais promotores de saúde (SILVESTRE *et al.*, 2013). Essa característica tem despertado o interesse na prospecção de peptídeos bioativos oriundos da caseína do leite com funções regulatórias nos organismos (BHAT; KUMAR; BHAT, 2015).

O processo de proteólise enzimática é a forma comumente utilizada para a obtenção de peptídeos bioativos, devido a possibilidade de aplicação de variáveis, tais como, as condições da relação enzima:substrato, tempo, pH, temperatura, tipo e origem da enzima empregada (KETNAWA *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2016).

A bromelina, neutrase, papaína e tripsina são enzimas proteolíticas que possuem a capacidade de clivar ligações peptídicas internas das proteínas, sendo denominadas de endopeptidases (ROMANOVA; SWEEDLER, 2015). A utilização de endopeptidases favorece a geração de peptídeos com diferentes sequências aminoácídicas. Esse processo é considerado positivo do ponto de vista biotecnológico, pois fatores intrínsecos dos peptídeos como tamanho, disposição aminoácídica, carga elétrica e massa molecular influenciam a sua bioatividade (JOANA GIL-CHÁVEZ *et al.*, 2013).

Os peptídeos derivados de proteínas lácteas possuem características que permitem que sejam uma fonte de antioxidantes, dentre elas, apresentam anéis aromáticos que são doadores de elétrons e têm caráter hidrofóbico apropriado (SILA; BOUGATEF, 2016; AGRAWAL; JOSHI; GUPTA, 2017). Esses componentes bioativos podem ser isolados e/ou administrados sob a forma de nutracêuticos garantindo aumento na quantidade dessas moléculas e sua absorção diretamente na circulação sanguínea, sendo direcionado para o local celular específico (McCLEMENTS *et al.*, 2015).

Estudos anteriores reportaram que peptídeos derivados da caseína do leite de ruminantes, exerceram ação antioxidante, através dos ensaios de eliminação dos radicais ABTS (2,2' – azinobis-3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico) (ABDEL-HAMID *et al.*, 2017), DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil), superóxido e hidroxila (WANG *et al.*, 2015), quelação de ferro e cobre (BAMBAD *et al.*, 2017).

Neste sentido, o presente estudo comparou a atividade antioxidante de diferentes hidrolisados da caseína de bubalina, bovina e caprina, obtidos pela ação das enzimas bromelina, neutrase, papaína e tripsina, através de ensaios de eliminação dos radicais ABTS (2,2' – azinobis-3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico), DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil), superóxido, hidroxila e pela quelação de ferro e cobre.

## METODOLOGIA

### Obtenção da caseína do leite

Os caseinatos de sódio das espécies bovina (CBOV), bubalina (CBUB) e caprina (CCAP) foram obtidos empregando-se metodologia descrita por Egito *et al.* (2007).

Resumidamente, o leite foi desnatado por centrifugação (2100 x g por 30 minutos à 32 °C). O material (precipitado) foi separado, pH ajustado para 4,6 com HCl 1 M e novamente centrifugado. Em seguida, o precipitado foi lavado em água destilada por três vezes ajustando-se para pH 7, com NaOH 1 M. O ciclo precipitação/solubilização foi repetido por duas vezes e dialisada contra água deionizada a 4 °C e, posteriormente, liofilizada.

### Preparação dos hidrolisados de caseinato bovino, bubalino e caprino

Os caseinatos foram hidrolisados empregando a metodologia descrita por Ruiz, Ramos e Recio (2004), com algumas modificações. Resumidamente, os caseinatos foram solubilizados em tampão fosfato de sódio 0,1 M, e posteriormente submetidos as enzimas comerciais: bromelina (60 °C e pH 6,5), papaína (50 °C e pH 6,5); tripsina (37 °C e pH 8,0) e neutrase (50 °C e pH 7,5), individualmente com a relação enzima:substrato correspondente a 1:100, em condições especificadas pelos fabricantes. Aliquotas do material foram coletadas nos tempos de 0, 30, 60, 120, 240, 360 e 480 minutos. A reação foi interrompida por aquecimento a 100 °C por 10 minutos. Posteriormente, os hidrolisados foram armazenados e mantidos sob temperatura de congelamento (-6 °C).

### Determinação do grau de hidrólise

A quantidade de L-leucina livre foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Benjakul e Morrissey (1997), com alguns ajustes. Foram empregados 31,25 µL de cada hidrolisado, 0,5 mL de tampão fosfato (0,3 M, pH 8,2), em seguida adicionou-se 250 µL de solução de TNBS (ácido 2,4,6-trinitrobenzenossulfônico) a 0,01%. A mistura reacional foi incubada em banho maria a 50 °C por 30 minutos. Posteriormente interrompida com a adição de 0,5 mL de sulfato de sódio (0,1 M), sendo mantida ao abrigo da luz por 15 minutos a temperatura ambiente (24 °C). A absorbância foi lida a 420 nm em espectrofotômetro (Biochrom® Libra S22 UV/Vis, MA, EUA) e os aminoácidos expressos em relação a L-leucina. O grau de hidrólise (GH) foi calculado de acordo com a equação:

$$GH = \left[ \frac{(A_t - A_0)}{A_{\max} - A_0} \right] \times 100$$

Onde  $A_t$  é a quantidade de ligações peptídicas clivadas no tempo t.  $A_0$  é a quantidade de aminoácido da proteína presente no substrato original.  $A_{\max}$  é a quantidade de aminoácidos presentes na proteína original obtidos após hidrólise ácida (HCl 6 M a 100 °C durante 24 h).

### Atividade de eliminação do radical hidroxila

Os ensaios de eliminação do radical hidroxila foram determinados de acordo com a metodologia descrita por Zhu *et al.* (2006), com alguns ajustes. Foram misturados

30 µL da amostra contendo os diferentes hidrolisados, 50 µL de 1,10-fenantrolina (5 mM), 50 µL de FeSO<sub>4</sub> (5 mM), 50 µL de EDTA (15 mM) e 30 µL de tampão fosfato de sódio (0,2 M, pH 7,4) em microplacas de 96 poços de poliestireno (Corning®, Tewksbury, MA, EUA). Após 5 minutos, 60 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi adicionado para iniciar a reação de eliminação. A mistura reacional foi incubada por 1 h a 37 °C, a absorbância foi mensurada a 340 nm empregando leitor de microplaca Assays UVM 340 (Biochrom®, Cambridge, Reino Unido). A atividade de eliminação do radical hidroxila foi calculado de acordo com a equação:

$$AERH (\%) = \left( \frac{A_{\text{Amostra}} - A_{\text{Degradada}}}{A_{\text{Não Degradada}} - A_{\text{Degradada}}} \right) * 100$$

Onde, os grupos degradados contêm todos os reagentes envolvidos na reação, exceto pelo uso de água substituindo a amostra. O grupo não-degradado corresponde as soluções da amostra do grupo degradado exceto pelo uso de água substituindo o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### Atividade de eliminação do radical superóxido

A atividade de eliminação do radical superóxido (RS) foi determinada de acordo com o método descrito por Bambad *et al.* (2017), com alguns ajustes. Resumidamente, 80 µL das amostras hidrolisadas foram misturadas a 80 µL de tampão Tris-HCl-EDTA 50 mM (1 mM, pH 8,2). A mistura reacional foi incubada a 25 °C por 10 minutos. Posteriormente, adicionou-se 40 µL de solução de pirogalol 1,5 mM, empregou-se tampão Tris-HCl-EDTA como controle. A absorbância foi determinada a 340 nm por 5 minutos. A capacidade de eliminação do radical superóxido foi quantificada de acordo com a equação:

$$RS (\%) = [(\Delta A_{\text{Controle}} / \text{min} - \Delta A_{\text{Amostra}} / \text{min}) / (\Delta A_{\text{Controle}} / \text{min})] * 100$$

Na qual,  $A_{\text{controle}} / \text{min}$  representa a absorbância por minuto da solução controle contendo pirogalol e tampão, e  $A_{\text{amostra}} / \text{min}$  representa a absorbância por minuto da amostra.

#### Atividade de eliminação do radical DPPH

O efeito de eliminação das amostras frente ao radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil) foi determinado de acordo com a metodologia previamente descrita por Yen e Chen (1995), modificada por Duan *et al.* (2006). A mistura reacional consistiu em 200 µL da amostra contendo os hidrolisados e 200 µL de solução etanólica de DPPH (0,16 mM). A reação foi incubada por 30 min no escuro, e a absorbância mensurada a 517 nm. A habilidade de eliminação do radical DPPH foi calculado usando a equação:

$$DPPH (\%) = \left[ 1 - \left( \frac{A_{\text{Amostra}} - A_{\text{Amostra branco}}}{A_{\text{Controle}}} \right) \right] * 100$$

Onde, o  $A_{\text{amostra}}$  é a absorbância das amostras,  $A_{\text{amostra branco}}$  é a absorbância da amostra sem o DPPH e  $A_{\text{controle}}$  é a absorbância do controle (solução de DPPH sem amostra).

#### Atividade de eliminação do radical ABTS

O ensaio de atividade antioxidante envolveu a eliminação do radical cátion ABTS<sup>•+</sup>, gerado a partir da oxidação de 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS) (7 mM), com persulfato de potássio (2,45 mM) pré-incubados ao abrigo da luz por 12 horas antes da utilização. A solução ABTS<sup>•+</sup> foi ajustada para absorbância de  $0,70 \pm 0,02$  a 734 nm em espectrofotômetro, por diluição em tampão fosfato (5 mM), sendo realizado de acordo com metodologia descrita por Re *et al.* (1999), modificada por Hernandez-Ledesma *et al.* (2005). Uma alíquota de 50 µL da amostra foi misturada a 950 µL da solução diluída de ABTS<sup>•+</sup>, a mistura reacional foi incubada por 10 minutos ao abrigo da luz, a temperatura ambiente (24 °C). A absorbância da reação foi mensurada a 734 nm e a atividade de eliminação do radical ABTS foi calculada de acordo com a equação:

$$ABTS (\%) = \left[ \left( \frac{A_{\text{Controle}} - A_{\text{amostra}}}{A_{\text{Controle}}} \right) \right] * 100$$

Onde,  $A_{\text{amostra}}$  é a absorbância das amostras, e  $A_{\text{controle}}$  é a absorbância do controle negativo empregando tampão fosfato.

#### Atividade quelante de Cu<sup>2+</sup> e Fe<sup>2+</sup>

A atividade quelante de ferro foi realizada de acordo com a metodologia descrita em Sánchez-Vioque *et al.* (2012), com algumas modificações. Empregou-se 125 µL dos hidrolisados, misturados a 0,5 mL de tampão acetato de sódio (0,1 M, pH 4,9) e a 12,5 µL de solução Fe<sup>2+</sup> (2 mM). Após 30 minutos de incubação, foi adicionado 50 µL de solução ferrozina (5 mM), decorrido mais 30 minutos, e posteriormente, realizado leitura 562 nm.

A atividade quelante de cobre foi realizada de acordo com a metodologia descrita Saiga *et al.* (2003) com modificações, em que 0,5 mL de tampão acetato de sódio (50 mM, pH 6) foi misturado a 12,5 µL de solução de CuSO<sub>4</sub> (5 mM) e 125 µL do hidrolisado. Essa mistura foi incubada por 30 minutos e em seguida adicionado 12,5 µL da solução de violeta de pirocatecol (4 mM), após mais 30 minutos de incubação, a mistura foi lida a 632 nm em espectrofotômetro.

Para ambas as atividades o controle negativo foi realizado com água ao invés da amostra, o controle positivo foi realizado com solução de EDTA a 0,045%, a porcentagem de inibição foi determinada de acordo com a equação:

$$AQ (\%) = \left[ \frac{(A_{\text{Controle}} - A_{\text{Amostra}})}{A_{\text{Controle}}} \right] * 100$$

## Análise estatística

Os parâmetros foram analisados em triplicata e os dados expressos como média e coeficiente de variação. O delineamento experimental utilizado foi um esquema fatorial (4 x 3 x 7), totalizando 84 ensaios. Diferenças significativas entre os caseinatos submetidos a diferentes tratamentos enzimáticos e tempo de hidrólise foram obtidas empregando análise de variância unidirecional seguida de avaliação de diferenças entre as médias empregando-se o teste de comparação múltiplas de Scott-Knott no *SISVAR* versão 5.6 (DEX/UFLA, Lavras, MG, BRASIL).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Grau de hidrólise

As enzimas bromelina, papaína, tripsina e neutrase apresentaram capacidade na clivagem dos caseinatos bovino (CBOV), bubalino (CBUB) e caprino (CCAP) no período de 480 minutos (Tabela 1). De modo geral, o caseinato bubalino apresentou os maiores valores de grau de hidrólise (GH%) em relação as demais espécies. De acordo com Zhang *et al.* (2016), há uma grande

homogeneidade entre os leites de búfala, cabra e vaca, entretanto diferem-se em relação a cadeia proteica, sobretudo na sequência aminoácídica presentes nas frações da caseína e no tamanho desta molécula.

Foi observado um aumento no comportamento do grau de hidrólise no decorrer do tempo (Tabela 1) corroborando com resultados reportados por Sbroggio *et al.* (2016), mostraram um aumento do GH% ao longo do tempo devido a liberação gradual de pequenos fragmentos de proteínas durante a catálise do caseinato.

Os maiores valores de GH% no tempo de 480 min. foram observados no tratamento com tripsina, principalmente para as espécies bovina (65,6%) e caprina (73,7%), diferindo estatisticamente entre si, enquanto que, a caseína bubalina apresentou maior GH% pela ação da bromelina (85,6%). Os menores valores médios de GH% foram observados para as espécies caprina e bubalina quando submetidas a ação da papaína, e bovina pela ação da neutrase. Essa variação em relação a ação enzimática pode ser atribuída à tanto do tempo de hidrólise quanto do sítio de clivagem (ABDEL-HAMID *et al.*, 2017; AYYASH *et al.*, 2018).

**Tabela 1** – Grau de hidrólise (%) da caseína bubalina, bovina e caprina pela ação da bromelina, papaína, tripsina e neutrase, após 480 minutos.

|     |           | Tempo (minutos)  |         |         |                  |         |         |         |
|-----|-----------|------------------|---------|---------|------------------|---------|---------|---------|
|     | Caseinato | 0                | 30      | 60      | 120              | 240     | 360     | 480     |
| BRO | CBUB      | 0,00Af           | 5,08Af  | 10,40Ae | 25,69Ad          | 36,77Ac | 64,84Ab | 85,64Aa |
|     | CBOV      | 0,00Ad           | 2,51Ad  | 12,38Ac | 14,23Bc          | 25,58Bb | 40,90Ba | 45,96Ba |
|     | CCAP      | 0,88Ad           | 6,24Ac  | 11,00Ac | 27,61Ab          | 31,96Ab | 40,61Ba | 43,87Ba |
|     |           | CV 1 (%) = 12,98 |         |         | CV 2 (%) = 17,48 |         |         |         |
| PAP | CBUB      | 0,00Ag           | 11,36Cf | 35,86Be | 43,65Ad          | 49,67Ac | 57,46Ab | 70,60Aa |
|     | CBOV      | 3,39Ad           | 37,43Bc | 38,30Bc | 40,70Bc          | 46,80Aa | 51,36Ba | 51,60Ba |
|     | CCAP      | 2,91Ac           | 45,23aB | 42,28Cb | 45,23Ab          | 49,26Aa | 50,19Ba | 51,28Ba |
|     |           | CV 1 (%) = 8,09  |         |         | CV 2 (%) = 5,20  |         |         |         |
| TRI | CBUB      | 12,27Ad          | 57,24Ac | 67,21Ab | 68,23Ab          | 61,16Ac | 67,12Ab | 75,30Aa |
|     | CBOV      | 1,56Be           | 36,04Bd | 45,31Bd | 57,71Bc          | 57,81Ab | 58,65Ab | 65,63Ba |
|     | CCAP      | 1,08Be           | 28,95Cd | 30,38Cc | 42,58Cb          | 53,35Ac | 59,81Bb | 73,68Aa |
|     |           | CV 1 (%) = 8,06  |         |         | CV 2 (%) = 8,06  |         |         |         |
| NEU | CBUB      | 8,36Ac           | 57,11Ab | 57,11Ab | 53,74Ab          | 55,52Ab | 59,61Ab | 73,67Aa |
|     | CBOV      | 1,19Ac           | 20,52Cb | 22,85Cb | 23,26Cb          | 20,67Cb | 29,41Ba | 34,54Ba |
|     | CCAP      | 0,00Ac           | 33,45Bb | 33,98Bb | 32,39Bb          | 42,14Bb | 62,42Aa | 60,84Ca |
|     |           | CV 1 (%) = 13,22 |         |         | CV 2 (%) = 14,17 |         |         |         |

Os valores médios com letras diferentes nas colunas (letras maiúsculas) e nas linhas (letras minúsculas) diferem significativamente ( $p < 0,05$ ). Brom: bromelina; Pap: Papaína; Tri: Tripsina; Neu: neutrase. CBUB: Caseinato bubalino hidrolisado; CBOV: caseinato bovino hidrolisado; CCAP: caseinato caprino hidrolisado. CV 1 (%): Coeficiente de variação do caseinato; CV 2 (%): Coeficiente de variação do tempo de hidrólise.

Fonte: autoria própria

Abdel-Hamid *et al.* (2017) ao utilizar uma relação enzima:substrato (1:10) superior que a do presente estudo (1:100) de papaína, pepsina e tripsina comercial para hidrólise de caseinato bubalino observaram GH% entre 23 e 33%, em 4 h de hidrólise com aumento relativo em relação ao tempo, resultados inferiores aos encontrados neste trabalho. Luo *et al.* (2014) obtiveram 20,4% de grau

de hidrólise com tratamento enzimático ao submeter caseinato bovino a ação proteolítica da papaína comercial em um período de 8 horas, o que demonstra o alto potencial de hidrólise dos caseinatos estudados e os altos graus de hidrólises obtidos no presente estudo.

### Eliminação do radical hidroxila

É possível observar que o potencial de eliminação do radical hidroxila entre as espécies (Tabela 2) foi maior para o hidrolisado caprino (4,8 a 100%) e menor para o caseinato bovino (12,1 a 66,7%), enquanto que o hidrolisado bubalino apresentou potencial intermediário a depender dos fatores enzima e tempo.

A neutrase destacou-se na clivagem do caseinato para obtenção de hidrolisados ricos em peptídeos capazes de eliminar o radical hidroxila com capacidade de 79,1%, 66,7% e 100% para os hidrolisados provenientes de caseinato bubalino, bovino e caprino, respectivamente após 8 horas de hidrólise de acordo com a Tabela 2.

**Tabela 2** – Eliminação do radical hidroxila (%) pelos hidrolisados obtidos pela ação de bromelina, papaína, tripsina e neutrase sobre a caseína do leite bubalino, bovino e caprino após 480 minutos de hidrólise.

|                   |      | Tempo (minutos)  |         |         |         |         |         |         |
|-------------------|------|------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Caseinato         |      | 0                | 30      | 60      | 120     | 240     | 360     | 480     |
| BRO               | CBUB | 55,95Ba          | 34,52Aa | 27,14Aa | 40,71Aa | 22,38Ba | 32,81Aa | 10,24Aa |
|                   | CBOV | 19,29Aa          | 29,52Aa | 24,52Aa | 38,10Aa | 33,10Ba | 28,57Aa | 34,76Aa |
|                   | CCAP | 45,18Ba          | 39,82Aa | 41,73Aa | 32,56Aa | 57,68Aa | 18,39Aa | 18,51Aa |
| CV 1 (%) = 80,50  |      | CV 2 (%) = 50,40 |         |         |         |         |         |         |
| PAP               | CBUB | 45,47Ba          | 28,95Ab | 13,81Ab | 38,33Ab | 45,47Ab | 10,45Ab | 69,53Ab |
|                   | CBOV | 33,10Aa          | 37,38Aa | 24,29Aa | 12,85Aa | 22,62Aa | 27,86Aa | 15,71Aa |
|                   | CCAP | 36,96Ba          | 5,41Aa  | 13,63Aa | 4,82Aa  | 7,92Aa  | 13,75Aa | 23,99Aa |
| CV 1 (%) = 92,24  |      | CV 2 (%) = 92,21 |         |         |         |         |         |         |
| TRI               | CBUB | 10,48Aa          | 13,33Aa | 13,57Aa | 18,10Aa | 21,67Aa | 15,00Aa | 11,67Aa |
|                   | CBOV | 13,33Aa          | 40,95Aa | 25,71Aa | 43,57Aa | 45,71Aa | 21,43Aa | 25,71Aa |
|                   | CCAP | 98,99Ba          | 39,94Ab | 47,80Ab | 21,60Ab | 32,08Ab | 30,65Ab | 50,89Ab |
| CV 1 (%) = 102,14 |      | CV 2 (%) = 70,56 |         |         |         |         |         |         |
| NEU               | CBUB | 56,19Aa          | 13,33Ab | 19,52Ab | 82,62Aa | 84,05Aa | 94,05Aa | 79,05Aa |
|                   | CBOV | 33,10Aa          | 45,95Aa | 12,14Aa | 11,43Ba | 31,91Aa | 29,52Ba | 66,67Aa |
|                   | CCAP | 20,42Ab          | 8,39Ab  | 41,96Ab | 88,27Aa | 70,18Aa | 100Aa   | 100Aa   |
| CV 1 (%) = 52,63  |      | CV 2 (%) = 66,51 |         |         |         |         |         |         |

Os valores médios com letras diferentes nas colunas (letras maiúsculas) e nas linhas (letras minúsculas) diferem significativamente ( $p < 0,05$ ). Brom: bromelina; Pap: Papaína; Tri: Tripsina; Neu: neutrase. CBUB: Caseinato bubalino hidrolisado; CBOV: caseinato bovino hidrolisado; CCAP: caseinato caprino hidrolisado. CV 1 (%): Coeficiente de variação do caseinato; CV 2 (%): Coeficiente de variação do tempo de hidrólise.

Fonte: autoria própria

A tripsina e a bromelina apresentaram baixa capacidade de hidrolisar a caseína bubalina em pontos que gerassem peptídeos capazes de se ligar ao radical hidroxila. O mesmo comportamento foi observado para o caseinato bovino (papaína) e caprino (bromelina e papaína) que geraram peptídeos com pouca habilidade para sequestrar o radical hidroxila. Esses resultados podem ser explicados segundo Lu *et al.* (2010) e Chakrabart, Jahandideh e Wu (2014) que afirmam que o radical superóxido apresenta baixa reatividade com moléculas orgânicas, o que dificulta o sequestro desse radical na ausência de um metal de transição.

A capacidade de eliminação do radical hidroxila é pouco explorada devido à complexidade das reações envolvidas, bem como a dificuldade de obtenção de material com esta atividade biológica. Silvestre *et al.* (2013) obtiveram capacidade anti-hidroxila de 15,5 a 49,8% ao empregar protease de *Aspergillus sojae* e 37,8 a 60% com pancreatina comercial por 5 horas de hidrólise em diferentes concentrações de enzima: substrato utilizando soro de leite como fonte proteica, resultados semelhantes ao do presente estudo o que demonstra a potencialidade do emprego de enzimas comerciais para obtenção de peptídeos bioativos anti-hidroxila oriundos de diferentes caseinatos.

### Eliminação do radical superóxido

Houve diferença significativa entre os caseinatos sobre ação da neutrase e tripsina na eliminação do radical ânion superóxido ( $p < 0,05$ ), não sendo observado o mesmo comportamento para os caseinatos quando submetidos ao tratamento com bromelina e papaína. De maneira geral, os hidrolisados oriundos da espécie bovina apresentaram maior potencial para eliminar o ânion superóxido (Tabela 3).

A capacidade de eliminação do ânion superóxido foi superior a 80% para os hidrolisados obtidos pela ação da bromelina e papaína, não apresentando diferença significativa entre os tempos de hidrólise, exceto entre o tempo zero para o CCAP. Os hidrolisados obtidos pela ação da tripsina sobre a caseína bubalina apresentaram maior potencial de eliminação do radical quando comparada as demais espécies, apresentando entre 13,7 e 36%. Os hidrolisados obtidos pela ação da neutrase sobre o CBOV demonstraram maiores resultados, entre 13,7 e 44,2%, enquanto que os hidrolisados caprinos frente a mesma enzima não demonstraram potencial para eliminar o radical ânion superóxido.

**Tabela 3 – Eliminação do radical superóxido (%) pelos hidrolisados obtidos pela ação de bromelina, papaína, tripsina e neutrase sobre a caseína do leite bubalino, bovino e caprino após 8 horas de hidrólise.**

|           |                  | Tempo (minutos) |         |         |                  |         |         |         |
|-----------|------------------|-----------------|---------|---------|------------------|---------|---------|---------|
| Caseinato |                  | 0               | 30      | 60      | 120              | 240     | 360     | 480     |
| Bro       | CBUB             | 93,51Aa         | 94,50Aa | 93,92Aa | 91,98Aa          | 91,13Aa | 86,89Aa | 94,23Aa |
|           | CBOV             | 87,43Aa         | 87,97Aa | 90,00Aa | 89,32Aa          | 83,38Aa | 90,81Aa | 87,03Aa |
|           | CCAP             | 81,71Ab         | 84,96Ab | 87,61Ab | 93,78Ab          | 91,22Ab | 94,59Ab | 48,24Ab |
|           | CV 1 (%) = 15,18 |                 |         |         | CV 2 (%) = 23,74 |         |         |         |
| Pap       | CBUB             | 90,63Ba         | 94,37Aa | 95,05Aa | 97,84Ba          | 94,87Aa | 94,50Aa | 95,45Aa |
|           | CBOV             | 75,81Aa         | 88,65Ab | 91,49Ab | 84,72Ab          | 90,54Ab | 88,92Ab | 89,32Ab |
|           | CCAP             | 92,97Ba         | 88,15Aa | 92,97Aa | 88,06Aa          | 94,10Aa | 91,71Aa | 90,54Aa |
|           | CV 1 (%) = 4,22  |                 |         |         | CV 2 (%) = 6,92  |         |         |         |
| Tri       | CBUB             | 35,68Aa         | 35,95Aa | 20,54Ab | 15,40Ac          | 15,41Bc | 13,65Bc | 17,70Aa |
|           | CBOV             | 0,00Bb          | 25,31Ba | 16,76Aa | 20,68Aa          | 23,11Aa | 20,74Aa | 0,00Bb  |
|           | CCAP             | 0,00Bd          | 27,16Ba | 14,86Bb | 10,41Bc          | 9,59Bc  | 0,00Bd  | 0,00Bd  |
|           | CV 1 (%) = 20,95 |                 |         |         | CV 2 (%) = 27,41 |         |         |         |
| Neu       | CBUB             | 12,03Aa         | 18,44Aa | 14,32Ba | 1,76Ba           | 0,00Bb  | 0,00Bb  | 0,00Bb  |
|           | CBOV             | 13,69Ab         | 34,19Aa | 37,43Aa | 36,35Aa          | 33,65Aa | 56,89Ab | 44,19Ab |
|           | CCAP             | 18,11Aa         | 0,00Bb  | 0,00Bb  | 0,00Bb           | 0,00Bb  | 0,00Bb  | 0,00Bb  |
|           | CV 1 (%) = 89,74 |                 |         |         | CV 2 (%) = 68,36 |         |         |         |

Os valores médios com letras diferentes nas colunas (letras maiúsculas) e nas linhas (letras minúsculas) diferem significativamente ( $p < 0,05$ ). Brom: bromelina; Pap: Papaína; Tri: Tripsina; Neu: neutrase. CBUB: Caseinato bubalino hidrolisado; CBOV: caseinato bovino hidrolisado; CCAP: caseinato caprino hidrolisado. CV 1 (%): Coeficiente de variação do caseinato; CV 2 (%): Coeficiente de variação do tempo de hidrólise.

Fonte: autoria própria

As atividades de eliminação dos radicais hidroxila e superóxido encontradas no presente trabalho indicam a potencialidade dos hidrolisados obtidos pela ação enzimática das proteases, sobre os diferentes caseinatos, demonstrando a importância destes na eliminação dos radicais livres mais conhecidos, os quais são oriundos sobretudo das reações endógenas de oxirredução no interior das células, incluindo  $\text{OH}^\cdot$ ,  $\text{O}^\cdot$ ,  $\text{HO}^\cdot$  e  $\text{ROO}^\cdot$  (LIU *et al.*, 2016).

### Eliminação do radical DPPH

Os hidrolisados proteicos obtidos pela ação de diferentes enzimas em um tempo de hidrólise total de 8 horas apresentaram eficiente potencial para atividade extinção do radical DPPH, excetuando-se a neutrase e a tripsina

que clivaram os caseinatos em sequências peptídicas que não exibiram capacidade de sequestrar o radical DPPH (Tabela 4), apresentando diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

Houve diferença estatística entre os caseinatos, dependendo do tratamento enzimático e do tempo avaliado, exceto os hidrolisados obtidos pela ação da neutrase pela ausência da capacidade de sequestrar o radical DPPH. Neste sentido, a espécie bovina destaca-se das demais em relação a atividade de eliminação do radical por apresentar atividade entre 0 e 41,7% com variação resultante do tratamento enzimático e do tempo de exposição.

O radical DPPH, que ao encontrar uma substância doadora de próton, como um peptídeo antioxidante, pode ser eliminado e a absorbância reduzida (ZHU *et al.*, 2006; YANG *et al.*, 2011).

**Tabela 4 – Eliminação do radical DPPH (%) pelos hidrolisados obtidos pela ação de bromelina, papaína, tripsina e neutrase, sobre a caseína do leite bubalino, bovino e caprino após 480 minutos de hidrólise.**

|           |                  | Tempo (minutos) |         |         |                  |         |         |         |
|-----------|------------------|-----------------|---------|---------|------------------|---------|---------|---------|
| Caseinato |                  | 0               | 30      | 60      | 120              | 240     | 360     | 480     |
| BRO       | CBUB             | 16,00Bc         | 30,17Ba | 25,97Ba | 30,17Ba          | 28,00Ba | 28,70Ba | 27,58Ba |
|           | CBOV             | 21,84Ac         | 28,48Bb | 39,93Aa | 39,04Aa          | 41,52Aa | 41,71Aa | 41,38Aa |
|           | CCAP             | 9,26Cc          | 40,58Aa | 38,90Aa | 39,13Aa          | 37,12Aa | 38,53Aa | 27,25Aa |
|           | CV 1 (%) = 9,38  |                 |         |         | CV 2 (%) = 9,34  |         |         |         |
| PAP       | CBUB             | 2,77Cb          | 32,14Ba | 32,18Ba | 33,26Aa          | 31,16Aa | 29,96Ba | 28,91Ba |
|           | CBOV             | 24,26Ab         | 41,38Aa | 38,25Aa | 38,11Aa          | 39,42Aa | 39,18Aa | 39,65Aa |
|           | CCAP             | 13,26Bc         | 39,65Aa | 43,81Aa | 42,92Aa          | 37,17Aa | 40,44Aa | 29,82Aa |
|           | CV 1 (%) = 5,30  |                 |         |         | CV 2 (%) = 12,91 |         |         |         |
| TRI       | CBUB             | 0,00Ab          | 0,00Bb  | 17,33Aa | 18,18Aa          | 21,75Aa | 25,61Ba | 0,00Ab  |
|           | CBOV             | 0,00Ab          | 17,52Aa | 18,78Aa | 18,18Aa          | 3,51Ca  | 0,00Ab  | 0,00Ab  |
|           | CCAP             | 0,73Ab          | 4,44Bb  | 11,30Aa | 7,74Ba           | 11,62Ba | 2,04Ab  | 0,00Ab  |
|           | CV 1 (%) = 51,33 |                 |         |         | CV 2 (%) = 54,33 |         |         |         |
| NEU       | CBUB             | 0,00Aa          | 0,00Aa  | 0,00Aa  | 0,00Aa           | 0,00Aa  | 0,00Aa  | 0,00Aa  |
|           | CBOV             | 0,00Aa          | 0,00Aa  | 0,00Aa  | 0,00Aa           | 0,00Aa  | 0,00Aa  | 0,00Aa  |
|           | CCAP             | 0,00Aa          | 0,00Aa  | 0,00Aa  | 0,00Aa           | 0,00Aa  | 0,00Aa  | 0,00Aa  |
|           | CV 1 (%) = 0,00  |                 |         |         | CV 2 (%) = 0,00  |         |         |         |

Os valores médios com letras diferentes nas colunas (letras maiúsculas) e nas linhas (letras minúsculas) diferem significativamente ( $p < 0,05$ ). Brom: bromelina; Pap: Papaína; Tri: Tripsina; Neu: neutrase. CBUB: Caseinato bubalino hidrolisado; CBOV: caseinato bovino hidrolisado; CCAP: caseinato caprino hidrolisado. CV 1 (%): Coeficiente de variação do caseinato; CV 2 (%): Coeficiente de variação do tempo de hidrólise.

Fonte: autoria própria

Os resultados encontrados no presente trabalho demonstram a alta capacidade dos hidrolisados provenientes das três espécies quando submetidas a ação proteolítica da bromelina e da papaína em sequestrar o DPPH, demonstrando a presença de substâncias doadoras nos peptídeos obtidos. Silvestre et al. (2013) ao avaliarem o uso de pancreatina comercial e uma protease microbiana na obtenção de peptídeos bioativos observaram a atividade de eliminação de DPPH entre 15 e 61% em 300 minutos, próximos aos obtidos nesse estudo. O que demonstra o alto potencial antioxidante dos hidrolisados obtidos empregando tratamentos enzimáticos com ação da bromelina, tripsina, papaína e neutrase.

### Eliminação do radical ABTS

Em relação a atividade de eliminação do radical ABTS (Tabela 5) não foram observadas diferenças significativas

na maioria dos hidrolisados das diferentes espécies e os tempos de hidrólise ( $p < 0,05$ ). Segundo Duarte-Neto *et al.* (2015) o radical ABTS é reduzido a um produto incolor na presença de moléculas antioxidantes capazes de doar hidrogênio ou quebrar as cadeias levando a diminuição desse radical ao meio, tem sido amplamente utilizado para testar a capacidade de compostos naturais atuarem como eliminadores de radicais livres, ou doadores de hidrogênio, como forma de avaliar os seus potenciais antioxidantes.

No presente estudo foi observado atividade antirradical ABTS superior a 85%, o que demonstra alto potencial de eliminação desse radical em todos os tempos avaliados. Observou-se que a velocidade de sequestro do radical é diferente entre as enzimas Bromelina>papaína>tripsina >neutrase.

**Tabela 5** – Eliminação do radical ABTS (%) pelos hidrolisados obtidos pela ação de bromelina, papaína, tripsina e neutrase sobre a caseína do leite bubalino, bovino e caprino no período de 480 minutos de hidrólise.

|     |           | Tempo (minutos)  |         |         |                  |         |         |         |
|-----|-----------|------------------|---------|---------|------------------|---------|---------|---------|
|     | Caseinato | 0                | 30      | 60      | 120              | 240     | 360     | 480     |
| BRO | CBUB      | 1,62Ab           | 94,57Aa | 94,87Aa | 96,46Aa          | 97,21Aa | 97,41Aa | 99,40Aa |
|     | CBOV      | 1,63Ac           | 67,75Ab | 97,51Aa | 98,16Aa          | 98,55Aa | 99,00Aa | 99,40Ba |
|     | CCAP      | 0,00Ab           | 97,10Aa | 97,40Aa | 98,16Aa          | 98,75Aa | 99,40Aa | 0,00Cb  |
|     |           | CV 1 (%) = 15,74 |         |         | CV 2 (%) = 15,28 |         |         |         |
| PAP | CBUB      | 1,63Ab           | 98,01Aa | 98,31Aa | 98,95Aa          | 96,36Ba | 98,85Aa | 99,30Aa |
|     | CBOV      | 0,00Ab           | 99,15Aa | 99,55Aa | 99,55Aa          | 99,50Aa | 99,45Aa | 99,47Aa |
|     | CCAP      | 0,00Ab           | 99,05Aa | 99,25Aa | 99,15Aa          | 99,40Aa | 99,35Aa | 1,63Ba  |
|     |           | CV 1 (%) = 1,04  |         |         | CV 2 (%) = 1,24  |         |         |         |
| TRI | CBUB      | 1,63Aa           | 99,30Aa | 99,65Aa | 99,45Aa          | 99,45Aa | 99,20Aa | 99,20Aa |
|     | CBOV      | 0,00Ac           | 99,30Aa | 93,87Bb | 99,35Aa          | 99,55Aa | 98,45Aa | 1,63Bc  |
|     | CCAP      | 0,00Ab           | 98,36Aa | 97,91Aa | 99,25Aa          | 99,96Aa | 99,56Aa | 1,62Bb  |
|     |           | CV 1 (%) = 3,35  |         |         | CV 2 (%) = 3,31  |         |         |         |
| NEU | CBUB      | 1,62Ab           | 99,05Aa | 99,60Aa | 99,05Aa          | 99,50Aa | 99,11Ba | 99,35Ba |
|     | CBOV      | 0,00Bd           | 98,40Ab | 98,05Ab | 100Aa            | 100Aa   | 100Aa   | 1,63Ac  |
|     | CCAP      | 0,00Bc           | 97,46Ab | 98,85Ab | 98,70Aa          | 98,80Aa | 97,76Bb | 100Aa   |
|     |           | CV 1 (%) = 1,34  |         |         | CV 2 (%) = 1,18  |         |         |         |

Os valores médios com letras diferentes nas colunas (letras maiúsculas) e nas linhas (letras minúsculas) diferem significativamente ( $p < 0,05$ ). Brom: bromelina; Pap: Papaína; Tri: Tripsina; Neu: neutrase. CBUB: Caseinato bubalino hidrolisado; CBOV: caseinato bovino hidrolisado; CCAP: caseinato caprino hidrolisado. CV 1 (%): Coeficiente de variação do caseinato; CV 2 (%): Coeficiente de variação do tempo de hidrólise.

Fonte: autoria própria

Os resultados obtidos no presente estudo diferem dos encontrados por Gobba *et al.* (2014) que mostraram uma atividade de eliminação do radical ABTS entre 47 e 87%, ao avaliar os hidrolisados derivados do caseinato caprino submetido a ação de subtilisina e tripsina por 12 horas de hidrólise.

### Atividade quelante de ferro

Os hidrolisados oriundos do CBOV, CBUB e CCAP submetidos aos diferentes tratamentos enzimáticos apresentaram atividade de quelação de ferro (Tabela 6). Observou-se atividade de quelação de ferro entre 0 e 100% de capacidade de quelar o metal de transição apresentando maior ou menor potencial em função do tempo, enzima e a espécie da fonte proteica.

**Tabela 6** – Capacidade quelante de ferro (%) exercido pelos hidrolisados obtidos pela ação de bromelina, papaína, tripsina e neutrase sobre a caseína do leite bubalino, bovino e caprino após 480 minutos de hidrólise.

|           |                  | Tempo (minutos) |         |         |                  |         |         |         |
|-----------|------------------|-----------------|---------|---------|------------------|---------|---------|---------|
| Caseinato |                  | 0               | 30      | 60      | 120              | 240     | 360     | 480     |
| BRO       | CBUB             | 47,53Aa         | 55,70Aa | 53,60Aa | 60,95Aa          | 55,54Ba | 46,14Ba | 0,00Bb  |
|           | CBOV             | 41,64Ac         | 66,63Aa | 67,45Aa | 76,23Aa          | 91,63Ab | 65,45Aa | 53,38Ac |
|           | CCAP             | 32,56Aa         | 40,68Ba | 0,00Bc  | 0,00Bc           | 8,74Cb  | 25,19Ca | 36,70Aa |
|           | CV 1 (%) = 13,57 |                 |         |         | CV 2 (%) = 23,99 |         |         |         |
| PAP       | CBUB             | 55,48Aa         | 73,32Aa | 68,41Aa | 68,63Aa          | 87,90Aa | 74,65Aa | 67,77Aa |
|           | CBOV             | 32,51Aa         | 66,65Aa | 61,79Aa | 63,45Aa          | 55,00Aa | 60,80Aa | 70,35Aa |
|           | CCAP             | 39,30Aa         | 57,75Aa | 59,15Aa | 56,26Aa          | 59,60Aa | 66,36Aa | 76,31Aa |
|           | CV 1 (%) = 26,61 |                 |         |         | CV 2 (%) = 20,34 |         |         |         |
| TRI       | CBUB             | 42,25Ab         | 62,22Bb | 55,98Ab | 69,12Aa          | 74,70Aa | 81,06Aa | 88,98Aa |
|           | CBOV             | 46,58Ab         | 39,38Ab | 57,27Aa | 69,97Aa          | 63,81Aa | 61,63Ba | 60,52Ba |
|           | CCAP             | 54,60Aa         | 63,71Ba | 44,05Aa | 60,90Aa          | 71,28Aa | 66,86Ba | 64,60Ba |
|           | CV 1 (%) = 18,54 |                 |         |         | CV 2 (%) = 16,84 |         |         |         |
| NEU       | CBUB             | 71,11Ba         | 57,69Ba | 58,24Ba | 53,54Ba          | 45,43Ba | 38,28Ba | 62,39Ba |
|           | CBOV             | 35,24Ca         | 71,84Ba | 61,52Ba | 54,37Ba          | 56,52Ba | 49,59Ba | 42,28Ba |
|           | CCAP             | 100Aa           | 100Aa   | 100Aa   | 100Aa            | 100Aa   | 100Aa   | 100Aa   |
|           | CV 1 (%) = 20,72 |                 |         |         | CV 2 (%) = 18,27 |         |         |         |

Os valores médios que carregam letras diferentes nas colunas (letras maiúsculas) e nas linhas (letras minúsculas) diferem significativamente ( $p < 0,05$ ). Brom: bromelina; Pap: Papaína; Tri: Tripsina; Neu: neutrase. CBUB: Caseinato bubalino hidrolisado; CBOV: caseinato bovino hidrolisado; CCAP: caseinato caprino hidrolisado. CV 1 (%): Coeficiente de variação do caseinato; CV 2 (%): Coeficiente de variação do tempo de hidrólise.

Fonte: autoria própria

No que diz respeito a ação enzimática para obtenção de hidrolisados e peptídeos nos diferentes caseinatos observou-se que houve diferença significativa quando submetidos a ação da neutrase no tempo 0 e tripsina nos tempos 30, 360 e 480 minutos, destacando o caseinato caprino que apresentou potencial máximo. Não foi observado diferença entre os caseinatos quando submetidos a ação da papaína, tripsina e bromelina, excetuando o CBUB que apresenta diferença entre os tempos de hidrólise.

De maneira análoga, o tempo não apresentou efeito significativo em relação a obtenção de hidrolisados com a capacidade quelante de ferro, ou seja, independentemente do tempo empregado na clivagem dos caseinatos foi possível obter pequenos fragmentos proteicos capazes de quelar o ferro.

O caseinato bubalino submetido a ação enzimática apresentou maior capacidade de quelação quando comparado as demais espécies em relação a neutrase 28,3 a

35,9%, tripsina 5,3 a 74,3%, papaína 32,4 a 72,9% e bromelina 18,8 a 79,8. Há uma relação entre o aumento no GH% e o aumento da atividade quelante de ferro nos hidrolisados oriundos da espécie bubalina, o mesmo não foi observado nos hidrolisados das demais espécies.

#### Atividade quelante de cobre

Os hidrolisados da espécie caprina apresentaram resultados entre 0,2 e 79%, já os fragmentos proteicos oriundos do caseinato bovino apresentaram capacidade de quelar cobre entre 13,1 e 73,1% e o bubalino entre 5,3 e 79,8%, variando com a enzima e do tempo de hidrólise. Os maiores valores de quelação de cobre foram observados nos hidrolisados obtidos empregando papaína e bromelina, entretanto, não se observou diferença significativa entre os caseinatos, o mesmo ocorreu com a espécie caprina para tais enzimas (Tabela 7).

**Tabela 7** – Capacidade quelante de cobre (%) exercido pelos hidrolisados obtidos pela ação de bromelina, papaína, tripsina e neutrase sobre a caseína do leite bubalino, bovino e caprino no período de 480 minutos de hidrólise.

|           |                  | Tempo (minutos) |          |         |                  |         |         |         |
|-----------|------------------|-----------------|----------|---------|------------------|---------|---------|---------|
| Caseinato |                  | 0               | 30       | 60      | 120              | 240     | 360     | 480     |
| BRO       | CBUB             | 18,81Bc         | 79,83Aa  | 74,71Aa | 73,23Aa          | 61,54Bb | 72,88Aa | 72,90Aa |
|           | CBOV             | 27,67Ac         | 73,08Aa  | 67,12Aa | 66,84Aa          | 54,39Ba | 70,07Ab | 69,78Aa |
|           | CCAP             | 33,33Ab         | 74,54Aa  | 73,93Aa | 65,18Aa          | 73,93Aa | 75,87Aa | 64,81Aa |
|           | CV 1 (%) = 9,86  |                 |          |         | CV 2 (%) = 10,16 |         |         |         |
| PAP       | CBUB             | 52,95Aa         | 32,39Cb  | 65,33Aa | 59,10Aa          | 72,18Aa | 63,88Aa | 72,88Aa |
|           | CBOV             | 17,53Bb         | 54,02Ba  | 59,41Aa | 59,32Aa          | 66,38Aa | 55,05Aa | 64,86Aa |
|           | CCAP             | 32,70Bb         | 76,63Aa  | 78,88Aa | 77,24Aa          | 67,28Aa | 79,20Aa | 75,37Aa |
|           | CV 1 (%) = 34,55 |                 |          |         | CV 2 (%) = 20,27 |         |         |         |
| TRI       | CBUB             | 5,25Ab          | 63,63Bb  | 72,44Aa | 58,16Aa          | 60,82Aa | 74,30Aa | 64,75Aa |
|           | CBOV             | 13,80Ab         | 45,19Aa  | 37,76Aa | 55,30Aa          | 46,00Aa | 45,48Ba | 41,22Ba |
|           | CCAP             | 0,20Ab          | 26,00Bb  | 32,74Aa | 40,72Aa          | 41,64Aa | 46,44Ba | 52,33Ba |
|           | CV 1 (%) = 29,29 |                 |          |         | CV 2 (%) = 27,39 |         |         |         |
| NEU       | CBUB             | 29,06Aa         | 28,60 Aa | 28,28Aa | 26,82Aa          | 30,65Aa | 30,65Aa | 35,93Aa |
|           | CBOV             | 19,56Ba         | 23,72Aa  | 25,05Aa | 30,30Aa          | 24,57Aa | 19,69Ba | 29,66Aa |
|           | CCAP             | 9,65Cc          | 37,31Ba  | 24,23Ab | 22,83Ab          | 9,77Bc  | 14,74Bc | 21,19Bb |
|           | CV 1 (%) = 31,08 |                 |          |         | CV 2 (%) = 21,59 |         |         |         |

Os valores médios com letras diferentes nas colunas (letras maiúsculas) e nas linhas (letras minúsculas) diferem significativamente ( $p < 0,05$ ). Brom: bromelina; Pap: Papaína; Tri: Tripsina; Neu: neutrase. CBUB: Caseinato bubalino hidrolisado; CBOV: caseinato bovino hidrolisado; CCAP: caseinato caprino hidrolisado. CV 1 (%): Coeficiente de variação do caseinato; CV 2 (%): Coeficiente de variação do tempo de hidrólise.

Fonte: autoria própria

Observa-se que os hidrolisados originados da ação proteolítica da neutrase demonstrou menores potenciais de quelação de ferro para as três espécies avaliadas.

Bambad *et al.* (2017) avaliaram o efeito da pressão atmosférica e de diferentes enzimas na hidrólise de lactoglobulina e obtiveram resultados semelhantes ao do presente estudo, a capacidade de quelação de ferro observado foi de 16 a 92% empregando seis proteases comerciais (neutrase, alcalase, savinase, elastase, termolisina e tripsina).

A atividade de quelação dos íons ferro e cobre está relacionada a atividade antioxidante devido à importância desses metais na catálise de espécies reativas de oxigênio, sendo extremamente importantes na eliminação dos radicais hidroxila e o superóxido, que podem ocasionar peroxidação lipídica e dano ao DNA (ZHANG *et al.*, 2010; ZHUANG *et al.*, 2013).

Sendo assim, a presença da capacidade de quelar ferro e cobre presente nos hidrolisados desse estudo podem desempenhar papel importante no controle do estresse oxidativo, já que, o acúmulo excessivo desses metais de transição pode acarretar em estresse oxidativo, associado a diversas patologias, como doenças degenerativas, doenças cardiovasculares, hiperglicemia, entre outros (JOMOVA; ALKO, 2011).

Além disso, hidrolisados derivados da caseína e das lactoproteínas apresentam multifuncionalidades que podem ser empregadas como ingredientes que visam melhorar a funcionalidade de alimentos na indústria, uma vez que aumenta seu valor nutricional ou biológico, atua prevenindo reações oxidativas nos alimentos processados acarretando, no aumento do tempo de prateleira, e também, na saúde humana (GOBBA *et al.*, 2014; LUO *et al.*, 2014; AHMED *et al.*, 2015).

## CONCLUSÃO

Os hidrolisados proteicos obtidos do caseinato bubalino, bovino e caprino derivados da ação das proteases bromelina, papaína, neutrase e tripsina apresentaram potencial para eliminação dos radicais ABTS, DPPH, superóxido, hidroxila, além da capacidade quelante de ferro e cobre. O tempo de 240 minutos mostrou-se mais promissor para a produção de peptídeos derivados das caseínas estudadas com propriedade antioxidante. Além disso, os hidrolisados oriundos do caseinato bubalino apresentaram potencial antioxidante mais promissor. Diante disso, os resultados observados no presente estudo, encorajam aplicação desses hidrolisados na indústria de alimento.

## REFERÊNCIAS

- ABDEL-HAMID, M. *et al.* Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity and antioxidant capacity of bioactive peptides derived from enzymatic hydrolysis of buffalo milk proteins. **International Dairy Journal**, Barking, v. 66, p. 91-98, 2017.
- AGRAWAL, H; JOSHI, R; GUPTA, M. Isolation and characterisation of enzymatic hydrolysed peptides of green tender sorghum and their antioxidant activities. **LWT-Food Science and Technology**, London, v. 84, p. 608 – 616, 2017.
- AHMED, A. S. *et al.* Identification of potent antioxidant bioactive peptides from goat milk proteins. **Food Research International**, Essex, v. 74, p. 80-88, 2015.
- AYYASH, *et al.* In vitro investigation of anticancer and ACE-inhibiting activity,  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibition, and antioxidant activity of camel milk fermented with camel milk probiotic: a comparative study with fermented bovine milk. **Food Chemistry**, Barking, v. 239, p. 588-597, 2018.
- BAMDAD, F. *et al.* Anti-Inflammatory and antioxidant properties of casein hydrolysate produced using high hydrostatic pressure combined with proteolytic enzymes. **Molecules**, Berlin, v. 22, n. 4, p. 609, 2017.
- BARBOSA, K. B. F. *et al.* Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.
- BENJAKUL, S.; MORRISSEY, M. T. Protein hydrolysates from pacific whiting solid wastes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 45, p. 3423–3430, 1997.
- BHAT, Z. F.; KUMAR, S.; BHAT, Hina Fayaz. Bioactive peptides of animal origin: a review. **Journal of Food Science and Technology**, London, v. 52, n. 9, p. 5377-5392, 2015.
- CHAKRABARTI, S; JAHANDIDEH, F; WU, J. Food-derived bioactive peptides on inflammation and oxidative stress. **BioMed Research International**, Hindawi, v. 2014, 2014.
- GOBBA, C. *et al.* Antioxidant peptides from goat milk protein fractions hydrolysed by two commercial proteases. **International Dairy Journal**, Barking, v. 39, n. 1, p. 28-40, 2014.
- DUAN, X. *et al.* Evaluation of antioxidant property of extract and fractions obtained from a red alga, *Polysiphonia urceolata*. **Food Chemistry**, Barking, v. 95, n. 1, p. 37-43, 2006.
- DUARTE NETO, J. M. W. *et al.* Production of antioxidant hydrolysate from bovine casein using immobilized *Penicillium aurantiogriseum* protease on magnetic nanoparticles. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, São Paulo, v. 1, n. 2, p. 3149-3155, 2015.
- EGITO, A. S. *et al.* Milk-clotting activity of enzyme extracts from sunflower and albizia seeds and specific hydrolysis of bovine  $\kappa$ -casein. **International Dairy Journal**, Barking, v. 17, n. 7, p. 816-825, 2007.
- 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**, Washington, v. 53, p. 588–593, 2005.
- JOANA GIL-CHÁVEZ, G. *et al.* Technologies for extraction and production of bioactive compounds to be used as nutraceuticals and food ingredients: an overview. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, n. 1, p. 5-23, 2013.
- JOMOVA, K.; VALKO, M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. **Toxicology**, Amsterdam, v. 283, n. 2, p. 65-87, 2011.
- KEPEKÇI, R. A. *et al.* Protective effect of *Spirulina platensis* enriched in phenolic compounds against hepatotoxicity induced by CCl<sub>4</sub>. **Food chemistry**, Barking, v. 141, n. 3, p. 1972-1979, 2013.
- KETNAWA, S. *et al.* Gelatin hydrolysates from farmed giant catfish skin using alkaline proteases and antioxidative function of simulated gastro-

- intestinal digestion. **Food Chemistry**, Barking, v. 192, p. 34-42, 2016.
- LIU, R. *et al.* A review of antioxidant peptides derived from meat muscle and by-products. **Antioxidants**, [s.l.], v. 5, n. 3, p. 32, 2016.
- LÜ, J. *et al.* Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, Bucharest, v. 14, n. 4, p. 840-860, 2010.
- LUO, Y. *et al.* Physical, chemical and biochemical properties of casein hydrolyzed by three proteases: Partial characterizations. **Food Chemistry**, Barking, v. 155, p. 146-154, 2014.
- McCLEMENTS, D. J. *et al.* Enhancing nutraceutical performance using excipient foods: designing food structures and compositions to increase bioavailability. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, [s.l.], v. 14, n. 6, p. 824-847, 2015.
- RE, R. *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 26, p. 1231 – 1237, 1999.
- ROMANOVA, E. V.; SWEEDLER, J. V. Peptidomics for the discovery and characterization of neuropeptides and hormones. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 36, n. 9, p. 579-586, 2015.
- SAIGA, A. I.; TANABE, S.; NISHIMURA, T. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 51, n. 12, p. 3661-3667, 2003.
- SÁNCHEZ-VIOQUE, R. *et al.* In vitro antioxidant and metal chelating properties of corm, tepal and leaf from saffron (*Crocus sativus* L.). **Industrial Crops and Products**, [s.l.], v. 39, p. 149-153, 2012.
- SBROGGIO, M. F. *et al.* Influence of the degree of hydrolysis and type of enzyme on antioxidant activity of okara protein hydrolysates. **Food Science and Technology**, London, v. 36, n. 2, p. 375-381, 2016.
- SILA, A.; BOUGATEF, A. Antioxidant peptides from marine by-products: Isolation, identification and application in food systems. A review. **Journal of Functional Foods**, [s.l.], v. 21, p. 10-26, 2016.
- SILVESTRE, M. P. S. *et al.* Whey as a source of peptides with high antioxidant activity: use of pancreatin and *Aspergillus sojae* protease. **Publicações UEPG Ciências Biológicas e Saúde**, Ponta Grossa, v. 19, n. 2, p. 143-147, 2013.
- WANG, L. *et al.* Isolation and characterisation of in vitro and cellular free radical scavenging peptides from corn peptide fractions. **Molecules**, Berlin, v. 20, n. 2, p. 3221-3237, 2015.
- YANG, P. *et al.* Antioxidant activity of bigeye tuna (*Thunnus obesus*) head protein hydrolysate prepared with Alcalase. **International Journal of Food Science & Technology**, Oxford, v. 46, n. 12, p. 2460-2466, 2011.
- YEN, G. C.; CHEN, H. Y. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 43, p. 27-37, 1995.
- ZHANG, L. *et al.* Inhibitory effect of raspberries on starch digestive enzyme and their antioxidant properties and phenolic composition. **Food Chemistry**, Barking, v. 119, n. 2, p. 592-599, 2010.
- ZHANG, Y. *et al.* Comparison of dipeptidyl peptidase IV-inhibitory activity of peptides from bovine and caprine milk casein by in silico and in vitro analyses. **International Dairy Journal**, Barking, v. 53, p. 37-44, 2016.
- ZHU, K. X.; ZHOU, H. M.; QIAN, H. F. Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. **Process Biochemistry**, London v. 41, p. 1296–1302, 2006.
- ZHUANG, H.; TANG, N.; YUAN, Y. Purification and identification of antioxidant peptides from corn gluten meal. **Journal of Functional Foods**, [s.l.], v. 5, n. 4, p. 1810-1821, 2013.

---

Submetido em :10/09/2020

Aceito em: 09/09/2021