



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

GABRIELA CAVALLARO

**ESTUDO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA PROTEÍNA  
CONCENTRADA DE FEIJÃO (*PHASEOLUS VULGARIS* L.) PARA  
OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS.**

CAMPINAS

2019

**GABRIELA CAVALLARO**

**ESTUDO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA PROTEÍNA  
CONCENTRADA DE FEIJÃO (*PHASEOLUS VULGARIS* L.) PARA  
OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Ciência de Alimentos.

**Orientadora:** Profa. Dra. Hélia Harumi Sato

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À  
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO  
DEFENDIDA PELA ALUNA GABRIELA  
CAVALLARO E ORIENTADA PELA  
PROFA. DRA. HÉLIA HARUMI SATO.

CAMPINAS

2019

**Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s):** CNPq, 134608/2016-0

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos  
Márcia Regina Garbelini Sevillano - CRB 8/3647

C314e Cavallaro, Gabriela, 1991-  
Estudo da hidrólise enzimática da proteína concentrada de feijão  
(*Phaseolus vulgaris* L.) para obtenção de peptídeos bioativos / Gabriela  
Cavallaro. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Hélia Harumi Sato.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade  
de Engenharia de Alimentos.

1. *Phaseolus vulgaris* L.. 2. Proteínas. 3. Peptídeos bioativos. 4. Hidrólise  
enzimática. I. Sato, Hélia Harumi. II. Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Study of the enzymatic hydrolysis of concentrated bean protein  
(*Phaseolus vulgaris* L.) to obtain bioactive peptides

**Palavras-chave em inglês:**

*Phaseolus vulgaris* L.

Proteins

Bioactive peptides

Enzymatic hydrolysis

**Área de concentração:** Ciência de Alimentos

**Titulação:** Mestra em Ciência de Alimentos

**Banca examinadora:**

Hélia Harumi Sato [Orientador]

Cinthia Bau Betim Cazarin

Luciana Francisco Fleuri

**Data de defesa:** 28-01-2019

**Programa de Pós-Graduação:** Ciência de Alimentos

## **BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Hélia Harumi Sato  
Orientadora  
DCA/FEA/UNICAMP

---

Profa. Dra. Cinthia Bau Betim Cazarin  
Membro titular  
DEPAN/FEA/UNICAMP

---

Profa. Dra. Luciana Francisco Fleuri  
Membro titular  
IB/UNESP

A ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação e na Secretaria do Programa da Unidade.

*“Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, participar da responsabilidade coletiva por toda a humanidade.”*

*Marie Curie*

*Dedico este trabalho à minha família, ao meu  
namorado e amigos pelo apoio e incentivo.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus que sempre esteve comigo, iluminando e guiando meu caminho, me encorajando para realização dos meus sonhos.

Aos meus pais, Rose e Sidnei, pela confiança, por sempre estarem comigo, me ajudando em todas as fases da minha vida.

Ao meu namorado, Fernando, por todo apoio e incentivo, estando sempre ao meu lado.

Aos meus avós, Helenir e José, por todo amor e carinho.

À minha orientadora Profa. Dra. Hélia Harumi Sato, pela confiança, atenção e auxílio em todos os momentos do desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Ruann Janser Soares de Castro por todos os ensinamentos e instruções, que foram essenciais para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Bioquímica de Alimentos: Anna Luisa, Marília, Jéssika, Ieda, Vitor, Karol, Luiza e Gabi por todos os conhecimentos e ajuda que foram compartilhados.

Às técnicas e amigas do Laboratório de Bioquímica de Alimentos: Bia e Val, por sempre estarem dispostas a ajudar, pelo incentivo e torcida.

À Angélica, técnica do Laboratório de Bioaromas e Compostos Bioativos, por permitir e auxiliar na utilização do leitor de microplacas. À Patrícia, técnica do Laboratório de Extração, Termodinâmica aplicada e Equilíbrio (EXTRA-E), pela utilização e ajuda com o moinho de facas.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP que participaram e contribuíram para o meu aprendizado e desenvolvimento pessoal e profissional.

À UNICAMP e à Faculdade de Engenharia de Alimentos pela oportunidade e contribuição na minha formação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos (número do processo: 134608/2016-0).

À todos que estiveram comigo que de alguma forma participaram da minha trajetória no mestrado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

## RESUMO

A obtenção de peptídeos com atividade biológica, incluindo funções antioxidantes, anti-hipertensivas, anti-inflamatórias e inibição da polifenoloxidase a partir de hidrólise enzimática de proteínas tem sido estudada a fim de obter possíveis substitutos de substâncias químicas para medicamentos e conservantes de alimentos, principalmente por sua característica de baixa toxicidade. O presente trabalho visou à obtenção de peptídeos bioativos por meio da hidrólise enzimática de proteína concentrada de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) variedade carioca e vermelho, utilizando proteases. A hidrólise enzimática das amostras de proteína concentrada do feijão foi realizada aplicando-se planejamento experimental de misturas, utilizando três proteases comerciais: Flavourzyme® 500L, Alcalase® 2.4L e Neutrase® 0.8L. Amostras de 5 g da proteína concentrada de feijão em 45 mL de tampão fosfato 100 mM pH 7,0 e 50 U/mL das proteases, foram incubadas a 50°C com agitação de 100 rpm durante 2 horas. As amostras de proteínas de feijão carioca e vermelho hidrolisadas com proteases apresentaram atividade antioxidante superiores à amostra controle (sem tratamento enzimático). A amostra do ensaio 7 de proteína hidrolisada de feijão carioca preparada com  $\frac{1}{3}$  de Flavourzyme®,  $\frac{1}{3}$  de Alcalase® e  $\frac{1}{3}$  de Neutrase® apresentou maior capacidade antioxidante obtendo 113,91  $\mu\text{mol TE/g}$  para o método ABTS, 27,90  $\mu\text{mol TE/g}$  para FRAP e 825,2  $\mu\text{mol TE/g}$  para ORAC, enquanto que a amostra do ensaio 4 de proteína hidrolisada de feijão vermelho, preparada com a mistura de  $\frac{1}{2}$  de Flavourzyme® e  $\frac{1}{2}$  de Alcalase®, apresentou maior atividade antioxidante obtendo 68,14  $\mu\text{mol TE/g}$  para ABTS, 27,44  $\mu\text{mol TE/g}$  para FRAP e 620,44  $\mu\text{mol TE/g}$  para ORAC. As amostras de proteína hidrolisada de feijão carioca (Flavourzyme® + Alcalase® + Neutrase®) e vermelho (Flavourzyme® + Alcalase®), na concentração de 0,25 mg/mL aumentaram 17,64 % e 11,83% a inibição da atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) comparada com os respectivos controles. Nos testes de inibição da enzima hialuronidase (HIA) as amostras controles e amostras hidrolisadas da proteína de feijão carioca e vermelho nas concentrações de 1 a 25 mg/mL apresentaram valores de inibição similares, não sendo observado um aumento na inibição da atividade de HIA com a aplicação das amostras hidrolisadas. O mesmo ocorreu para os testes de inibição da enzima polifenoloxidase (PFO) de maçã, em que nas concentrações de 1 a 6 mg/mL das amostras hidrolisadas de proteína de feijão carioca e vermelho não foi obtido aumento na

inibição da PFO de maçã em relação as amostras controles. Na inibição da PFO de pera, a proteína hidrolisada de feijão carioca, nas concentrações de 4 mg/mL e 6 mg/mL, aumentou cerca de 5,7% e 4,8% a inibição da PFO de pera em relação aos respectivos controles, enquanto que a proteína hidrolisada de feijão vermelho nas concentrações de 4 mg/mL e 6 mg/mL aumentou cerca de 7,99% e 9,22% a inibição da PFO de pera em relação aos respectivos controles. Os hidrolisados obtidos de proteína de feijão carioca e vermelho apresentaram resultados promissores na aplicação como antioxidantes, com valores superiores aos controles (proteína não hidrolisada), demonstrando um efeito positivo da hidrólise enzimática.

**Palavras-chave:** *Phaseolus vulgaris* L., proteínas, peptídeos bioativos, hidrólise enzimática.

## ABSTRACT

The obtaining of peptides with biological activity, including antioxidant, antihypertensive and anti-inflammatory functions and the inhibition of polyphenoloxidase, by way of enzymatic protein hydrolysis, was studied in order to obtain possible substitutes for chemical substances used as drugs and food preservatives, mainly due to their low toxicity characteristics. The present work aimed to obtain bioactive peptides by means of the enzymatic hydrolysis of concentrated protein extracts obtained from beans (*Phaseolus vulgaris* L.) of the carioca and red varieties, using proteases. The enzymatic hydrolysis of the concentrated bean protein samples was carried out by applying an experimental mixture design with three commercial proteases: Flavourzyme® 500L, Alcalase® 2.4L and Neutrase® 0.8L. Samples of 5 g of the bean protein concentrates in 45 mL of 100 mM phosphate buffer pH 7.0 and 50 U / ml of the proteases were incubated at 50°C with shaking at 100 rpm for 2 hours. The samples of carioca and red bean proteins hydrolyzed with proteases showed higher antioxidant activity than the control samples (without enzymatic treatment). Sample n° 7 made from carioca bean protein hydrolyzed with  $\frac{1}{3}$  Flavourzyme®,  $\frac{1}{3}$  Alcalase® and  $\frac{1}{3}$  Neutrase® showed the highest antioxidant capacity, obtaining 113.91  $\mu\text{mol TE / g}$  for the ABTS method, 27.90  $\mu\text{mol TE / g}$  for FRAP and 825.2  $\mu\text{mol TE / g}$  for ORAC, whereas sample n° 4 made from the red bean protein, hydrolyzed with a mixture of  $\frac{1}{2}$  Flavourzyme® and  $\frac{1}{2}$  of Alcalase®, presented the highest antioxidant activity, with 68.14  $\mu\text{mol TE / g}$  for ABTS, 27.44  $\mu\text{mol TE / g}$  for FRAP and 620.44  $\mu\text{mol TE / g}$  for ORAC. The samples of protein hydrolyzed of carioca bean (Flavourzyme® + Alcalase® + Neutrase®) and red bean (Flavourzyme® + Alcalase®) at a concentration of 0.25 mg / mL increased respectively 17.64% and 11.83% inhibition of the angiotensin converting enzyme (ACE) activity compared to the respective controls. In the inhibition tests of the hyaluronidase enzyme (HIA), the control and hydrolysed protein samples of the carioca and red bean at concentrations of 1 to 25 mg / mL showed similar inhibition values, with no increase in inhibition of HIA activity with the application of the hydrolyzed samples. The same occurred for the inhibition tests of the apple enzyme polyphenoloxidase (PPO), in which at the concentrations of 1 to 6 mg / mL of the hydrolyzed protein samples of carioca and red bean did not obtain increase in the inhibition of apple PPO in relation the controls samples. In the inhibition of pear PPO, the hydrolyzed protein carioca bean at

concentrations of 4 mg / mL and 6 mg / mL increased the inhibition of pear PPO by 5.7% and 4.8% in relation to the respective control, whereas the red bean hydrolyzed protein at concentrations of 4 mg / mL and 6 mg / mL increased by about 7.99% and 9.22% inhibition of pear PPO relative to the respective control. The hydrolysates obtained from carioca and red bean protein presented promising results in the application as antioxidants, with values higher than the controls (non hydrolyzed protein), demonstrating a positive effect of the enzymatic hydrolysis.

**Keywords:** *Phaseolus vulgaris* L., proteins, bioactive peptides, enzymatic hydrolysis.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Ilustração do sistema renina-angiotensina-aldosterona .....	30
<b>Figura 2</b> – Estruturas de medicamentos inibidores da ECA e os seus peptídeos análogos ... .....	32
<b>Figura 3</b> – Reações de escurecimento enzimático catalisada pela polifenoloxidase (1) e (2) e formação de melaninas (3).....	35
<b>Figura 4</b> – Exemplos de estruturas químicas de compostos fenólicos presentes em feijão comum: (A) ácido gálico, (B) ácido p-coumárico, (C) catequina, (D) kaempferol e (E) delfinidina-3-glucosídeo .....	38
<b>Figura 5</b> – Fluxograma do processo de extração da proteína concentrada de feijão .....	40
<b>Figura 6</b> – Fluxograma da preparação de hidrolisados de proteína de feijão e avaliação das atividades biológicas .....	44
<b>Figura 7</b> – Curvas de contorno e gráfico de valores experimentais versus valores preditos para atividades antioxidantes ( $\mu\text{mol TE/g}$ ) de hidrolisados protéicos de feijão carioca avaliada por: captura de radical ABTS (A), ensaio FRAP (B) e ORAC (C) .....	63
<b>Figura 8</b> – Curvas de contorno e gráfico de valores experimentais versus valores preditos para atividades antioxidantes ( $\mu\text{mol TE/g}$ ) de hidrolisados protéicos de feijão vermelho avaliada por: captura de radical ABTS (A), ensaio FRAP (B) e ORAC (C) .....	64
<b>Figura 9</b> – Efeito da concentração da amostra de proteína hidrolisada de feijão carioca e do controle na inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA).....	69
<b>Figura 10</b> – Efeito da concentração da amostra de proteína hidrolisada de feijão vermelho e do controle na inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) .....	70
<b>Figura 11</b> – Efeito da concentração da amostra de proteína hidrolisada de feijão carioca e do controle na inibição da enzima hialuronidase (HIA).....	72
<b>Figura 12</b> – Efeito da concentração da amostra de proteína hidrolisada de feijão vermelho e do controle na inibição da enzima hialuronidase (HIA).....	72
<b>Figura 13</b> – Efeito da concentração da amostra de proteína hidrolisada de feijão carioca e da amostra controle na inibição do extrato enzimático de polifenoloxidase (PFO) de maçã .....	74
<b>Figura 14</b> – Efeito da concentração da amostra de proteína hidrolisada de feijão carioca e da amostra controle na inibição do extrato enzimático de polifenoloxidase (PFO) de pera ..	

.....	75
<b>Figura 15</b> – Efeito da concentração da amostra de proteína hidrolisada de feijão vermelho e da amostra controle na inibição do extrato enzimático de polifenoloxidase (PFO) de maçã.....	76
<b>Figura 16</b> – Efeito da concentração da amostra de proteína hidrolisada de feijão vermelho e da amostra controle na inibição do extrato enzimático de polifenoloxidase (PFO) de pera. ....	76

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Composição de aminoácidos essenciais e não essenciais (mg/g) da proteína total e das diferentes frações da proteína de feijão .....	22
<b>Tabela 2</b> – Proteases microbianas, pH e temperatura ótima de atividade e micro-organismos produtores .....	24
<b>Tabela 3</b> – Peptídeos com atividades antioxidante, inibitória da enzima conversora de angiotensina (ECA) e anti-inflamatória obtidos a partir de hidrólise enzimática de proteínas .....	25
<b>Tabela 4</b> – Principais métodos para a determinação da atividade antioxidante <i>in vitro</i> , mecanismos de reação e vantagens e desvantagens .....	29
<b>Tabela 5</b> – Matriz do planejamento experimental de misturas para a obtenção de peptídeos bioativos por meio da hidrólise enzimática de proteína concentrada de feijão utilizando diferentes preparações enzimáticas de proteases.....	42
<b>Tabela 6</b> – Porcentagem de proteína solúvel em TCA das amostras do planejamento experimental de misturas .....	54
<b>Tabela 7</b> – Atividades antioxidantes dos hidrolisados proteicos de feijão carioca, obtidos por meio do planejamento experimental de misturas .....	55
<b>Tabela 8</b> – Atividades antioxidantes dos hidrolisados proteicos de feijão vermelho, obtidos por meio do planejamento experimental de misturas .....	56
<b>Tabela 9</b> – Coeficientes de regressão para a capacidade antioxidante avaliada pelo método ABTS para a proteína hidrolisada de feijão carioca.....	57
<b>Tabela 10</b> – Coeficientes de regressão para a capacidade antioxidante avaliada pelo método FRAP para a proteína hidrolisada de feijão carioca .....	58
<b>Tabela 11</b> – Coeficientes de regressão para a capacidade antioxidante avaliada pelo método ORAC para a proteína hidrolisada de feijão carioca .....	58
<b>Tabela 12</b> – Coeficientes de regressão para a capacidade antioxidante avaliada pelo método ABTS para a proteína hidrolisada de feijão vermelho .....	59
<b>Tabela 13</b> – Coeficientes de regressão para a capacidade antioxidante avaliada pelo método FRAP para a proteína hidrolisada de feijão vermelho.....	59
<b>Tabela 14</b> – Coeficientes de regressão para a capacidade antioxidante avaliada pelo método ORAC para a proteína hidrolisada de feijão vermelho.....	59

<b>Tabela 15</b> – Análise de variância (ANOVA) incluindo modelos, R <sup>2</sup> e valores de probabilidade para os modelos reduzidos finais para atividades antioxidantes de hidrolisados proteicos de feijão carioca.....	60
<b>Tabela 16</b> – Análise de variância (ANOVA) incluindo modelos, R <sup>2</sup> e valores de probabilidade para os modelos reduzidos finais para atividades antioxidantes de hidrolisados proteicos de feijão vermelho .....	61
<b>Tabela 17</b> – Análise da atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos de feijão carioca obtidos com as enzimas Flavourzyme®, Alcalase® e Neutrase® (ensaio 7).....	65
<b>Tabela 18</b> – Análise da atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos de feijão carioca obtidos com as enzimas Flavourzyme®, Alcalase® e Neutrase® (ensaio 4).....	66
<b>Tabela 19</b> – Capacidade redutora total, flavonóides e taninos condensados nas amostras de proteína de feijão carioca hidrolisada e controle (sem tratamento enzimático) .....	67
<b>Tabela 20</b> – Capacidade redutora total, flavonóides, taninos condensados e antocianinas nas amostras de proteína de feijão vermelho hidrolisada e controle (sem tratamento enzimático) .....	68

## SUMÁRIO

<b>1 - INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
<b>2 – OBJETIVOS</b> .....	<b>20</b>
2.1 - Objetivo geral .....	20
2.2 - Objetivos específicos.....	20
<b>3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>21</b>
3.1 - Feijão.....	21
3.2 - Hidrólise enzimática de proteínas e obtenção de peptídeos bioativos .....	23
3.3 - Potencial biológico de hidrolisados proteicos.....	26
3.3.1 – Atividade antioxidante.....	26
3.3.2 – Inibição da enzima conversora de angiotensina – Atividade anti-hipertensiva .....	30
3.3.3 – Inibição da enzima hialuronidase – Atividade anti-inflamatória .....	32
3.3.4 – Inibição da enzima polifenoloxidase .....	34
3.4 – Compostos interferentes .....	36
<b>4 - MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>38</b>
4.1 - Substratos e obtenção da proteína concentrada de feijão.....	38
4.2 – Determinação do teor de proteínas.....	41
4.3 – Obtenção dos hidrolisados de proteína concentrada de feijão .....	41
4.3.1 - Proteases e determinação da atividade enzimática .....	41
4.3.2 - Estudo da hidrólise enzimática da proteína concentrada de feijão, por planejamento experimental de misturas.....	42
4.3.3 - Proteína solúvel em ácido tricloroacético.....	45
4.4 – Avaliação das atividades biológicas dos hidrolisados de proteína concentrada de feijão.....	45
4.4.1 - Atividade antioxidante.....	45
4.4.1.1 - Método da capacidade sequestradora do radical ABTS+ .....	45
4.4.1.2 - Ensaio FRAP: método de redução de ferro.....	46
4.4.1.3 – Determinação da capacidade antioxidante pelo ensaio ORAC .....	46
4.4.1.4 – Efeito da concentração dos hidrolisados proteicos sobre as atividades biológicas . .....	47
4.4.2 – Inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) .....	47

4.4.3 – Inibição da enzima hialuronidase (HIA).....	48
4.4.4 - Inibição da polifenoloxidase (PFO) .....	49
4.5 – Determinação do teor de compostos interferentes.....	50
4.5.1 – Capacidade redutora total.....	50
4.5.2 – Flavonóides totais.....	51
4.5.3 – Taninos condensados .....	51
4.5.4 – Antocianinas monoméricas .....	51
<b>5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>53</b>
5.1 - Extração e determinação do teor da proteína concentrada de feijão.....	53
5.2 - Planejamento experimental de misturas e hidrólise enzimática.....	53
5.3 - Avaliação da capacidade antioxidante dos hidrolisados proteicos .....	54
5.4 – Avaliação estatística do planejamento experimental de misturas. ....	57
5.5 – Análise das curvas de contorno .....	61
5.6 – Caracterização dos compostos interferentes.....	67
5.7 – Avaliação da atividade inibitória da enzima conversora de angiotenina (ECA).....	69
5.8 – Avaliação da inibição da enzima hialuronidase (HIA).....	71
5.9 – Avaliação da inibição da enzima polifenoloxidase (PFO) .....	73
<b>6 – CONCLUSÕES.....</b>	<b>78</b>
<b>PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>80</b>
<b>7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>81</b>

## 1 - INTRODUÇÃO

As proteínas são componentes fundamentais dos alimentos. São consideradas fonte de aminoácidos essenciais e de energia, necessários para o crescimento e manutenção de funções fisiológicas (SARMADI & ISMAIL, 2010). Durante a digestão, as proteínas são hidrolisadas por proteases do trato gastrointestinal gerando uma grande variedade de peptídeos, os quais podem apresentar propriedades bioativas, sendo considerados potenciais alimentos funcionais (RYDER et al., 2016). Alguns peptídeos derivados dos alimentos apresentam características estruturais análogas com peptídeos endógenos que atuam no organismo como neurotransmissores, hormônios ou agentes reguladores. Dessa forma, os peptídeos exógenos podem interagir com os receptores dos peptídeos endógenos e exercer funções semelhantes (HERNÁNDEZ-LEDESMA et al., 2014).

Um alimento funcional pode ser definido como qualquer alimento, que além das funções nutritivas básicas, apresenta benefícios adicionais à saúde, regulando uma ou mais funções no organismo (DIPLOCK et al., 1999; HERNÁNDEZ-LEDESMA et al., 2011).

Pesquisadores têm estudado amplamente as propriedades dos alimentos funcionais, buscando uma terapia alternativa para auxiliar no tratamento de diversas doenças, incluindo estresse oxidativo, doenças cardiovasculares, obesidade, hipertensão, diabetes, inflamação e câncer. Essas perturbações fisiológicas e morfológicas podem estar associadas ao uso excessivo de aditivos sintéticos nos alimentos, dieta não balanceada e aumento na taxa de infecções (BASHO & BIN, 2010; SAADI et al., 2015).

Nos últimos anos, muitos estudos revelaram propriedades antioxidantes, anti-hipertensivas, antimicrobiana, imunomoduladoras, anti-diabéticas e anti-inflamatórias dos alimentos, incluindo soja, soro de leite e também peixes, devido aos seus compostos bioativos, como por exemplo, os peptídeos (BIZIULEVICIUS et al., 2006; TSOU et al., 2010; ZHANG et al., 2010; TAVARES et al., 2011; AHN et al., 2015). Além disso, alguns estudos mostraram a capacidade de peptídeos em inibir a polifenoloxidase, uma enzima envolvida no escurecimento de frutas e vegetais e que afeta diretamente a qualidade desses alimentos (PUANGPHET et al., 2015).

Os peptídeos são constituídos por sequências de 2 a 20 aminoácidos, de comprimento de cadeia variável e com baixa massa molecular (inferior a 6000 Da). Quando a proteína nativa é submetida a digestão enzimática pode ocorrer a produção de fragmentos

ativos, chamados, biopeptídeos ou peptídeos bioativos (SARMADI & SMAIL, 2010; SAADI et al., 2015).

A bioatividade é definida principalmente pela composição e sequência de aminoácidos (SARMADI & ISMAIL, 2010). Essa enorme diversidade funcional coloca os peptídeos e as proteínas em posição de destaque no campo das aplicações biotecnológicas (MIRANDA & LIRIA, 2008), sendo apontados por alguns autores como possíveis substitutos de substâncias químicas utilizadas como fármacos ou conservantes de alimentos (HONG et al., 2008; UHLIG et al., 2014).

Processos envolvendo hidrólise enzimática de proteínas têm sido estudados para a produção de peptídeos com atividade biológica. De acordo com os Bancos de Dados Biopep e BioPD (*Bioactive Peptide Database*), mais de 3000 diferentes peptídeos bioativos encontram-se registrados em suas bases (SINGH et al., 2014).

A utilização de peptídeos bioativos na área farmacêutica têm apresentado resultados promissores, no tratamento de doenças cardiovasculares, infecciosas e de origem metabólica. Os peptídeos apresentam uma importante vantagem competitiva em relação aos medicamentos tradicionais devido a algumas características, como: 1) são moléculas que apresentam alta especificidade pelas células ou tecidos alvos, resultando em baixo ou nenhum efeito tóxico e exigindo baixas concentrações para uma atuação efetiva. Essa característica é extremamente importante, principalmente para os tratamentos de doenças durante um tempo prolongado; 2) as pequenas moléculas químicas presentes nos medicamentos tradicionais muitas vezes apresentam efeito cumulativo no organismo. Em casos de metabolismo deficiente, incluindo os mecanismos de biotransformação, transporte, absorção e excreção, no qual estas moléculas seriam excretadas ainda na forma ativa, a possibilidade de danos ao ambiente torna-se alta. Por outro lado, peptídeos sofrem pouco ou nenhum acúmulo no organismo e são facilmente degradados no ambiente (UHLIG et al., 2014).

O presente projeto visou estudar a obtenção de hidrolisados de proteína concentrada de feijão das variedades carioca e vermelho e avaliar as atividades antioxidante, anti-hipertensiva, anti-inflamatória e a inibição da polifenoloxidase.

## **2 – OBJETIVOS**

### **2.1 - Objetivo geral**

Estudar as bioatividades dos peptídeos obtidos por meio da hidrólise enzimática da proteína concentrada de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) das variedades carioca e vermelho.

## **2.2 - Objetivos específicos**

- Obtenção de proteína concentrada de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) das variedades carioca e vermelho;
- Verificar a presença de compostos interferentes, como compostos fenólicos e pigmentos, nas amostras de proteína concentrada de feijão;
- Avaliar a hidrólise enzimática das amostras de proteína concentrada de feijão utilizando três preparações comerciais de protease (Flavourzyme® 500L, Alcalase® 2.4L e Neutrase® 0.8L) na forma isolada ou em combinações binárias e ternárias para determinação da formulação mais adequada para obtenção de hidrolisados proteicos com base em suas atividades biológicas;
- Determinar as atividades antioxidante, anti-hipertensiva, anti-inflamatória e inibição da enzima polifenoloxidase dos hidrolisados proteicos obtidos;
- Avaliar o efeito da concentração das amostras sobre as atividades biológicas.

## **3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **3.1 - Feijão**

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é um dos alimentos mais produzidos e consumidos mundialmente. De acordo com a FAO (2016), estima-se que a produção mundial de feijão atingiu 23 milhões de toneladas em 2013, sendo o Brasil responsável por 13% dessa produção, atingindo cerca de três milhões de toneladas. Os maiores mercados consumidores incluem América do Sul (9,3 kg/per capita/ano), Caribe (9,1 kg/per capita/ano), América Central (8,8 kg/per capita/ano) e África Central (8,0 kg/per capita/ano).

O feijão é considerado uma boa fonte de proteínas (16-33%), vitaminas, minerais e carboidratos complexos (DE LA FUENTE et al., 2012). As proteínas do feijão são divididas em quatro frações: globulina, albumina, glutelina e a prolamina. A globulina corresponde a 54% a 79% da proteína total do feijão, a albumina de 12% a 30%, a glutelina de 20% a 30% e a prolamina de 2% a 4% (MONTROYA et al., 2010). Dessa forma, as globulinas correspondem a maior fração de proteínas do feijão e ainda são divididas nas frações 7S e 11S de acordo com seus coeficientes de sedimentação. A fração 7S é também conhecida como faseolina e representa 40% a 50% da proteína total do feijão, enquanto a fração 11S representa apenas 10% (HAYAT et al., 2014).

A Tabela 1 ilustra as quantidades em mg/g de aminoácidos essenciais e não essenciais nas diferentes frações da proteína do feijão e na proteína total.

As faseolinas são caracterizadas pelo baixo teor de metionina e cisteína e elevada resistência à proteólise, resultando em valor nutricional limitado (CARRASCO-CASTILLA et al., 2012; LUNA-VITAL, 2014).

A baixa susceptibilidade da faseolina às enzimas proteolíticas são atribuídas a glicosilação da proteína, estrutura rígida e compacta repleta de folhas  $\beta$ , baixo potencial hidrofílico e limitação da acessibilidade das enzimas proteolíticas. As frações brutas de albumina e de glutelina de feijão também possuem baixos valores de digestibilidade (26 a 42%). A baixa digestibilidade da albumina ocorre devido à presença de um número elevado de pontes dissulfeto e a presença de 12% de carboidratos (HAYAT et al., 2014).

**Tabela 1** – Composição de aminoácidos essenciais e não essenciais (mg/g) da proteína total e das diferentes frações da proteína do feijão.

Aminoácidos	Proteína Total	Frações proteicas			
		Faseolina (7S)	11S	Albumina	Glutelina Prolamina

<b><i>Essencial</i></b>						
Arginina	63	53	48	65	61	71
Histidina	30	32	30	35	35	24
Isoleucina	48	43	49	43	62	57
Leucina	95	83	87	66	114	101
Lisina	76	64	78	109	81	59
Metionina	12	9	15	10	20	16
Fenilalanina	65	31	36	40	54	74
Treonina	47	30	49	74	46	39
Valina	57	59	70	49	66	79
<b><i>Não essencial</i></b>						
Alanina	51	36	69	49	49	47
Ácido Aspártico	120	152	95	142	112	95
Cisteína	1	3	6	2	-	1
Ácido Glutâmico	140	160	131	128	145	124
Glicina	56	40	80	47	44	52
Prolina	38	35	51	50	40	91
Serina	68	102	73	55	43	48
Tirosina	40	47	29	35	28	23

Fonte: MONTOYA et al., 2010.

O tratamento térmico pode alterar a estrutura das proteínas, contribuindo para o aumento da digestão das proteínas (HAYAT et al., 2014; MOJICA & MEJÍA, 2015). As estruturas terciárias e quaternárias da faseolina sofrem alteração pelo tratamento térmico, podendo aumentar significativamente as superfícies hidrofílicas, cerca de sete a nove vezes, ocasionando em um alto grau de hidrólise e também aumentando as taxas de digestão, sendo relatado um aumento de 82% na digestão *in vitro* e de 90% na taxa de digestão *in vivo* (MONTOYA et al., 2010; HAYAT et al., 2014).

O feijão apresenta em sua composição compostos bioativos, como os polifenóis, amido resistente, oligossacarídeos e é fonte de peptídeos bioativos e por esse motivo, o consumo de feijão têm sido associado à redução do risco de doenças cardiovasculares, diabetes, obesidade e câncer (LUNA-VITAL, 2014; KAMARUDIN & GAN, 2016).

### **3.2 - Hidrólise enzimática de proteínas e obtenção de peptídeos bioativos**

Vários métodos podem ser utilizados para a obtenção de peptídeos bioativos, entre eles, tratamento com proteases exógenas, digestão gastrointestinal, tratamento ácido ou alcalino e fermentação microbiana. A hidrólise enzimática, utilizando proteases é

geralmente a mais utilizada para gerar hidrolisados contendo peptídeos bioativos (BAH et al., 2016). Neste processo são aplicadas enzimas proteolíticas de origem animal, vegetal ou microbiana em condições controladas para obtenção de hidrólise limitada, que pode resultar na formação de peptídeos bioativos, diminuição da concentração de fatores alergênicos e aumento da digestibilidade da proteína (KORHONEN, 2009). É caracterizada como uma técnica segura, rápida e de fácil controle. São utilizadas condições de pH (6 – 8) e temperaturas (40 a 60°C) para manter a atividade da protease, evitando o uso de condições extremas, como os utilizados em muitos tratamentos físicos e químicos. Essa técnica pode ser utilizada para melhorar as propriedades funcionais e biológicas de proteínas, assim como agregar valor a subprodutos de baixo valor comercial (ZAREI et al., 2014; CASTRO & SATO, 2015; BAH et al., 2016).

As proteases catalisam a reação de hidrólise das ligações peptídicas das proteínas e ainda podem apresentar atividade sobre as ligações éster e amida. Todas as proteases apresentam certo grau de especificidade quanto ao substrato, em geral relacionado aos aminoácidos envolvidos na ligação peptídica a ser hidrolisada e àqueles adjacentes a eles (SANTOS & KOBLITZ, 2008). Essa especificidade em adição às condições de hidrólise utilizadas, incluindo a relação enzima-substrato (E / S), temperatura, pH e tempo de hidrólise afetam o grau de hidrólise, o tamanho e a sequência de aminoácidos dos peptídeos resultantes, além da quantidade de aminoácidos livres, que por sua vez influenciam a atividade biológica dos hidrolisados (TSOU et al., 2010; SARMADI & ISMAIL, 2010; BAH et al., 2016).

A utilização de uma protease na forma isolada ou combinação de diversas proteases com diferentes especificidades, como pepsina, tripsina, quimotripsina, bromelina, papaína, Alcalase<sup>®</sup>, Neutrase<sup>®</sup>, Flavourzyme<sup>®</sup> entre outras, tem sido utilizada como estratégia para a produção de peptídeos bioativos mais efetivos e estáveis por implicarem em tempos de reação reduzidos para obtenção do grau de hidrólise requerido assim como a obtenção de diferentes perfis, principalmente relacionados à composição e distribuição de massa molecular dos peptídeos. A duração da hidrólise tem relação inversa com o tamanho do peptídeo. Estes processos são especialmente utilizados em indústrias alimentícias e farmacêuticas utilizando proteases de origem animal, vegetal e microbiana (SINGH et al., 2014; RIZZELLO et al., 2016).

No entanto os custos associados a essas reações enzimáticas são altos, e por isso muitos pesquisadores estão empenhados na utilização de proteases microbianas (CASTRO & SATO, 2015; AGUILAR & SATO, 2018).

Micro-organismos são fontes de proteases atrativas, e podem ser cultivadas em grande escala em um período de tempo relativamente curto, por métodos de fermentação estabelecidos e geralmente as proteases microbianas são de origem extracelular, o que facilita o processo de extração da enzima quando comparada com proteases de origem vegetal ou animal (SHARMA et al., 2017).

Na Tabela 2 são apresentados exemplos de proteases microbianas utilizadas para a hidrólise de proteínas.

**Tabela 2** – Proteases microbianas, pH e temperatura ótima de atividade e micro-organismos produtores.

Protease comercial	Condições ótimas de atividade		Micro-organismo produtor
	pH	Temperatura (°C)	
Actinase E <sup>®</sup>	7 - 8	37	<i>Streptomyces griseus</i>
Alcalase <sup>®</sup>	6,5 - 8,5	60	<i>Bacillus licheniformis</i>
Corolase <sup>®</sup>	7 - 8	55	<i>Bacillus subtilis</i>
Flavourzyme <sup>®</sup>	5	50	<i>Aspergillus oryzae</i>
Neutrase <sup>®</sup>	7	40 - 50	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
Protamex <sup>®</sup>	8	60	<i>Bacillus sp</i>
Proteinase <sup>®</sup> A	6	25	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Termolisina <sup>®</sup>	5 - 8,5	65 - 85	<i>Bacillus thermoproteolyticus</i>

Fonte: Adaptada de Aguilar e Sato, 2018.

Peptídeos com atividades antioxidante, inibitória da enzima conversora de angiotensina (ECA) e anti-inflamatória foram isolados a partir de hidrolisados proteicos preparados com proteases microbianas, vegetais e animais (Tabela 3).

**Tabela 3** – Peptídeos com atividades antioxidante, inibitória da enzima conversora de angiotensina (ECA) e anti-inflamatória obtidos a partir de hidrólise enzimática de proteínas.

Proteína	Enzima	Sequência peptídica	Bioatividade	Referência
Endosperma de arroz	Neutrase®	FRDEHKK e KHDRGDEF Phe-Arg-Asp-Glu-His-Lys-Lys / Lys-His-Asp-Arg-Gly-Asp-Glu-Phe	Antioxidante	SARMADI & ISMAIL, 2010
Salmão	Alcalase®, Flavourzyme®, Neutrase®, pepsina, Protamex® e tripsina	SPHF Ser-Pro-His-Phe	Anti-inflamatória	AHN et al., 2012
Microalga ( <i>Spirulina máxima</i> )	Tripsina, $\alpha$ – quimotripsina e pepsina	LDAVNR e MMLDF Leu-Asp-Ala-Val-Ans-Arg / Met-Met-Leu-Asp-Phe	Anti-inflamatória	VO et al., 2013
Feijão vermelho pequeno	Alcalase®, papaína, pepsina, tripsina e $\alpha$ - quimotripsina	PVNNPQIH Pro-Val-Ans-Ans-Pro-Gln-Ile-His	Inibidor ECA	RUI et al., 2013
Feijão preto	Alcalase®	SKDGGPF Ser-Lys-Asp-Gly-Gly-Pro-Phe	Antioxidante; Inibidor ECA	ROCHA et al., 2015
Feijão carioca	Pepsina/ pancreatina	KPKL e PKKPK Lys-Pro-Lys-Leu / Pro-Lys-Lys-Pro-Lys	Antioxidante; Inibidor ECA	MOJICA & MEJÍA, 2015
Gelatina da pele de bacalhau	Pepsina	GASSGMPG e LAYA Gly-Ala-Ser-Ser-Gly-Met-Pro-Gly /Leu-Ala-Tyr-Ala	Inibidor ECA	NGO et al., 2016
Soja	Alcalase® / Flavourzyme®	FRDEHKK Phe-Arg-Asp-Glu-His-Lys-Lys	Antioxidante	LEO et al., 2016
Amaranto	Alcalase®	SSDEIKE Ser-Ser-Asp-Glu-Ihe-Lys-Glu	Anti-inflamatória	MORONTA et al., 2016
Trigo	Protease M®	IAP Ihe-Ala-Pro	Inibidor ECA	LEE & HUR, 2017
Ovo	Pepsina	YAEERYPIL Tyr-Ala-Glu-Glu-Arg-Tyr-Pro-Ile-Leu	Antioxidante; Inibidor ECA	

Nomenclatura aminoácidos: C- cisteína, H- histidina, I- isoleucina, M- metionina, S- serina, V- valina, A- alanina, G- glicina, L- leucina, P- prolina, T- treonina, F- fenilalanina, R- arginina, Y- tirosina, W triptofano, D- ácido aspártico, N- asparagina, E- ácido glutâmico, Q- glutamina, K- lisina.

### **3.3 - Potencial biológico de hidrolisados proteicos**

#### **3.3.1 - Atividade Antioxidante**

A formação de radicais livres, tais como superóxido ( $O_2^-$ ) e hidroxila ( $OH^-$ ), e ainda a espécie reativa peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) são normalmente formados em organismos aeróbios durante a respiração e também devido a alguns fatores exógenos, tais como, dieta deficiente em compostos antioxidantes, tabagismo, poluição, radiação ultravioleta, entre outros (ZHANG et al., 2009; BARBOSA et al., 2010).

Os sistemas antioxidantes de defesa podem eliminar essas espécies reativas por meio de enzimas (como superóxido dismutase e glutathione peroxidase) e também por meio de vitaminas antioxidantes, oligoelementos, coenzimas e cofatores. Porém, em algumas condições, o sistema de defesa endógena não protege o organismo contra os radicais livres, resultando em estresse oxidativo, em que a geração das espécies reativas excede a desativação das mesmas ou ainda quando a desativação é inadequada (SARMADI & ISMAIL, 2010). Essas espécies reativas, tal como os radicais livres, são muito instáveis e reagem rapidamente com outros grupos ou substâncias no organismo, ocasionando lesões celulares ou nos tecidos (ZHANG et al., 2009). Uma quantidade excessiva de radicais livres no organismo é associada ao desenvolvimento de várias doenças, como aterosclerose, artrite, diabetes e câncer (GU et al., 2015). Por serem espécies altamente reativas, os radicais livres podem causar danos às proteínas e mutações no DNA, oxidação de fosfolípidos de membranas celulares e modificação em lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (PIHLANTO, 2006; SARMADI & ISMAIL, 2010).

Antioxidantes são definidos como quaisquer substâncias que retardam ou inibem significativamente a oxidação de um substrato. São considerados nutracêuticos apresentando diversos benefícios à saúde. Atualmente, alguns antioxidantes sintetizados artificialmente como hidroxitolueno butilado (BHT), hidroxianisol butilado (BHA) e terc-butil-hidroquinona (TBHQ), têm sido empregados para prevenir os danos oxidativos em alimentos e biosistemas. No entanto, estes produtos químicos sofrem uma tendência de uso cada vez mais limitada por apresentar riscos potenciais à saúde humana, como danos ao DNA, toxicidade e efeitos colaterais (WANG et al., 2014a; CHI et al., 2015). Consequentemente, há um interesse crescente dos pesquisadores para obtenção de

moléculas antioxidantes mais seguras a partir de fontes naturais, como os peptídeos provenientes de proteínas hidrolisadas (SENPAN & BENJAKUL, 2014; CHI et al., 2015).

Os mecanismos de ação que explicam a atividade antioxidante de peptídeos não são totalmente compreendidos, mas vários estudos mostraram a capacidade de peptídeos em inibir a peroxidação lipídica (SAKANAKA et al., 2004), desativar radicais livres (GOMEZ-GUILLEN, 2010), quelar íons metálicos (ALEMAN et al., 2011) e desativar espécies reativas de oxigênio (ZHUANG & SUN, 2011).

Três mecanismos principais de reação são utilizados para a determinação da capacidade antioxidante: transferência de átomo de hidrogênio (HAT - *Hydrogen Atom Transfer*), transferência de um elétron (SET - *Single Electron Transfer*) e capacidade de quelar metais de transição (TMC - *Transition Metal Chelation*) (GANATO et al., 2018).

Em mecanismos HAT, o meio reacional é composto por um gerador sintético de radicais peroxila ( $\text{ROO}^\cdot$ ), espécies antioxidantes (provenientes da amostra ou padrão) e uma sonda molecular (substrato oxidável). Neste ensaio os antioxidantes inibem de modo competitivo a oxidação do substrato pela espécie reativa de oxigênio, doando um átomo de hidrogênio. Já o mecanismo baseado em SET, envolvem a espécie antioxidante e o agente antioxidante, sendo também a sonda molecular. O antioxidante doa um elétron para a sonda oxidada, causando diferenças na absorbância no UV-Visível. De maneira geral, ensaios com mecanismo SET detectam a capacidade da amostra em reduzir o oxidante, o qual não é necessariamente um radical livre, ao contrário de ensaios com mecanismo HAT (CASTELO-BRANCO & TORRES, 2011).

No mecanismo de quelação de metais de transição (TMC) ocorre a formação de complexos de coordenação estáveis. A formação do complexo antioxidante-metal pode ser determinada espectrofotometricamente utilizando ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) como padrão. Este método é utilizado como indicador da atividade antioxidante de um composto, uma vez que ao quelar metais, o antioxidante pode prevenir ou retardar a indução da peroxidação lipídica provocada por metais como o ferro e cobre (SILVA, 2016).

Na Tabela 4 são apresentados os principais métodos de determinação da atividade antioxidante *in vitro*, bem como o seu mecanismo de reação e as principais vantagens e desvantagens de cada método.

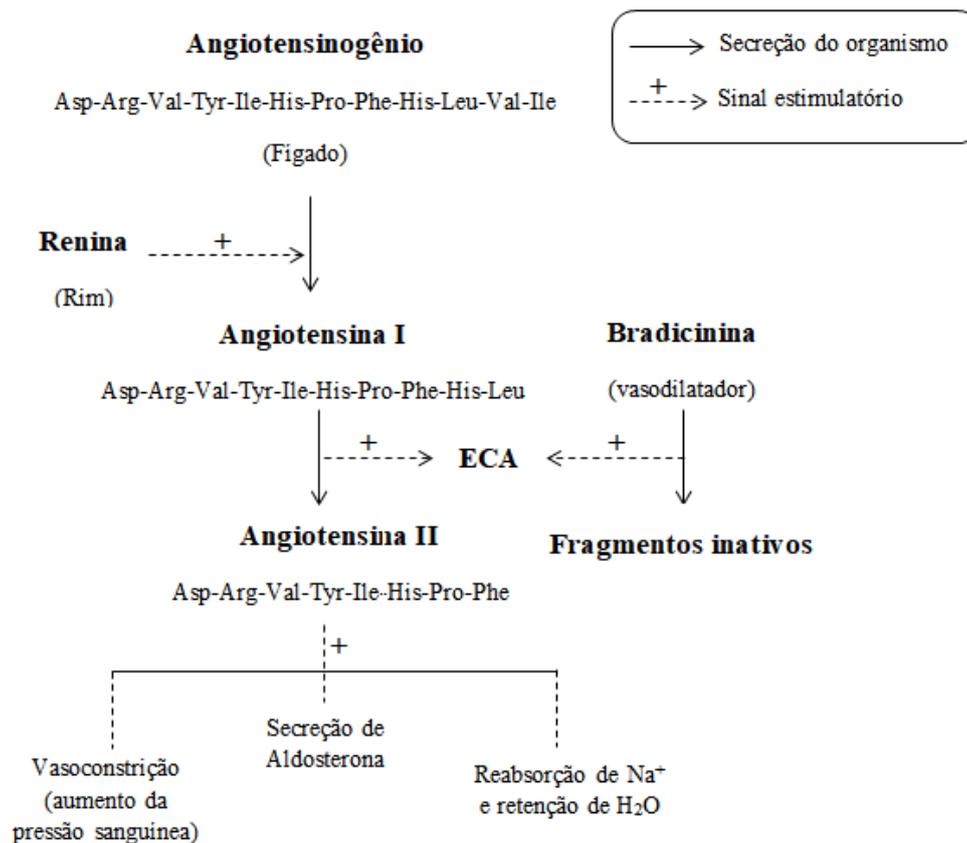
**Tabela 4** – Principais métodos para determinação da atividade antioxidante *in vitro*, mecanismos de reação, vantagens e desvantagens.

Método	Mecanismo de reação	Reação	Vantagens (+) e Desvantagens (-)	Referências
DPPH	HAT e SET	O radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) reage com antioxidantes doadores de hidrogênio ou elétron, mudando a cor do violeta para o amarelo. A reação é acompanhada por espectrometria de UV-Visível com a redução da absorbância a 517 nm.	(+) É um método fácil e reprodutível; (-) É capaz de medir mais compostos antioxidantes lipofílicos; (-) DPPH não é um radical fisiológico.	Castelo-Branco & Torres, 2011; Castro & Sato, 2015; Cömert & Gökmen, 2018.
ABTS (TEAC)	HAT e SET	O radical ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico)) é estabilizado na presença de radicais livres doadores de hidrogênio ou elétron, mudando a cor de verde escuro para verde claro. A reação é acompanhada por espectrometria de UV-Visível com a redução da absorbância a 734 nm.	(+) É um método fácil e reprodutível; (+) É capaz de medir compostos antioxidantes hidrofílicos e lipofílicos; (-) ABTS não é um radical fisiológico.	Castelo-Branco & Torres, 2011; Castro & Sato, 2015; Cömert & Gökmen, 2018.
FRAP	SET	Na presença de antioxidantes doadores de elétrons, o complexo Fe <sup>3+</sup> -TPTZ [2,4,6-Tripiridil-S-Triazina] é reduzido a Fe <sup>2+</sup> -TPTZ, alterando a cor de azul claro para azul escuro. A reação é acompanhada por espectrometria de UV-Visível com o aumento da absorbância a 593 nm.	(+) Bom representante do mecanismo de transferência de elétrons; (-) A taxa de reação dos íons férricos é lenta; (-) Desconsidera a cinética de reação.	Castelo-Branco & Torres, 2011; Castro & Sato, 2015; Cömert & Gökmen, 2018.
ORAC	HAT	O radical peroxil, gerado a partir da decomposição do dicloridrato de AAPH [2,2-azobis (2-amidinopropano)] na presença de oxigênio atmosférico, reage com um indicador fluorescente (fluoresceína) para produzir um produto não fluorescente. Na presença de antioxidantes, a fluorescência é mantida. A reação é acompanhada por fluorimetria pela medida da redução da fluorescência (excitação a 485 nm e emissão a 520 nm).	(+) É considerado tanto a taxa de iniciação quanto a taxa de progressão da oxidação; (+) Apresenta semelhança com método fisiológico; (-) É sensível a temperatura e concentração de oxigênio.	Castelo-Branco & Torres, 2011; Castro & Sato, 2015; Cömert & Gökmen, 2018.

### 3.3.2 – Inibição da enzima conversora de angiotensina - Atividade anti-hipertensiva

A hipertensão arterial afeta cerca de 25% da população adulta em todo o mundo, e há uma previsão de que este número atinja 29% da população até 2025, o que representa um total de 1,56 bilhões de pessoas (NGO et al., 2015). Embora seja um distúrbio controlável, a hipertensão está associada ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, como arteriosclerose, infarto de miocárdio e acidente vascular cerebral (SHEIH et al., 2009).

No sistema renina-angiotensina-aldosterona (Figura 1), a enzima conversora de angiotensina (ECA) é o componente principal que regula a pressão sanguínea, controlando a quantidade de fluidos no corpo. A ECA é responsável por catalisar a conversão de angiotensina I em angiotensina II, a qual é caracterizada por ser um potente vasoconstritor, além de inativar a bradicinina (vasodilatador) (RIZELLO et al., 2016).



**Figura 1-** Ilustração do sistema renina-angiotensina-aldosterona.

Fonte: Adaptada de Lee e Hur (2017).

A ECA é uma metaloprotease com zinco no sítio ativo e é classificada como dipeptidil carboxipeptidase que catalisa a hidrólise de dois resíduos de aminoácidos na região C-terminal de peptídeos (SANTOS et al., 2017).

Quando o organismo está em condições de hipotensão (vasodilatação), as células justaglomerulares dos rins liberam renina no sangue (UNDERWOOD & ADLER, 2013). A renina atua transformando o angiotensinogênio plasmático, produzido pelo fígado, em angiotensina I (decapeptídeo). Nos vasos pulmonares, a enzima conversora de angiotensina cliva o dipeptídeo (His-Leu) C-terminal da angiotensina I, resultando em um octapeptídeo, a angiotensina II, a qual é transportada para os rins via corrente sanguínea, onde irá estimular a vasoconstrição, aumentando a pressão arterial e também irá estimular a liberação do hormônio aldosterona, promovendo a absorção de sódio e água, contribuindo ainda mais para o aumento da pressão arterial. Com a inibição da enzima conversora de angiotensina I em angiotensina II, os inibidores da ECA produzem vasodilatação periférica, diminuindo a pressão arterial (MOTA, 2015; LEE & HUR, 2017).

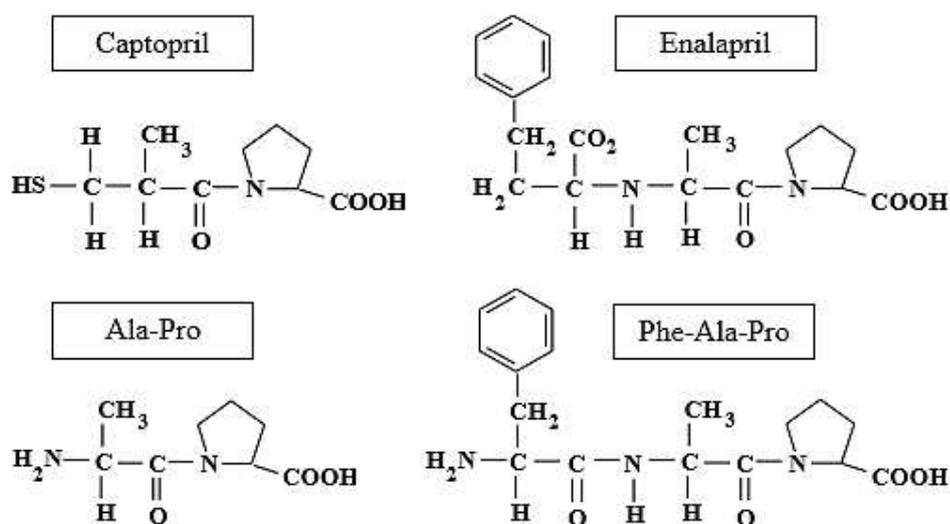
Os inibidores da ECA podem competir com o substrato natural para se ligarem com o  $Zn^{2+}$  no sítio ativo ou ainda se ligar à enzima por meio de ligações de hidrogênio ou

interações hidrofóbicas, em que aminoácidos hidrofóbicos podem se ligar na extremidade N-terminal da enzima conversora de angiotensina. E ainda a ECA tem seletividade para substratos ou inibidores competitivos, incluindo resíduos de aminoácidos hidrofóbicos nas posições terminais. Além disso, o mecanismo de inibição da ECA pode envolver uma interação com um local de ligação aniônica, distinto do local catalítico (LEE & HUR, 2017).

Os peptídeos com capacidade de inibir a enzima conversora de angiotensina são geralmente peptídeos com cadeias curtas, a qual é influenciada pela sequência na região carboxila terminal dos peptídeos, em que os aminoácidos como prolina, lisina e arginina podem estar presentes nesta posição (AGUILAR & SATO, 2018). Em um estudo realizado por Suetsuna (1998) foi observado que dipeptídeos contendo tirosina na posição carboxila terminal ocasionou uma redução lenta da pressão sanguínea, porém por um período prolongado, no entanto dipeptídeos contendo fenilalanina resultou em uma rápida queda da pressão sanguínea, mas com menor período de ação.

Captopril e enalapril são inibidores sintéticos da ECA, utilizados para tratamento de hipertensão e outras doenças relacionadas ao coração. Porém, os inibidores sintéticos podem causar diversos efeitos colaterais, como tosse, alteração do paladar, erupções cutâneas e angioedema (ALEMÁN et al., 2011).

Muitos tipos de peptídeos bioativos com atividade inibidora da ECA foram isolados de hidrolisados proteicos e produtos fermentados. O dipeptídeo Ala-Pro e o tripeptídeo Phe-Ala-Pro, por exemplo, apresentaram estruturas análogas às drogas captopril e enalapril, respectivamente (Figura 2).



**Figura 2** – Estruturas de medicamentos inibidores da ECA e os seus peptídeos análogos.

Fonte: Adaptada de MATSUI & MATSUMOTO, 2006.

### 3.3.3 - Inibição da enzima hialuronidase - Atividade anti-inflamatória

Inflamação é uma resposta biológica complexa do sistema imune do organismo a estímulos nocivos, como por exemplo, trauma e infecção (MÍLLAN-LINARES et al., 2014). Este processo está associado a liberação de mediadores inflamatórios, como prostaglandinas, por meio de reações enzimáticas, nas quais estão envolvidas as enzimas lipoxigenase, ciclooxigenase, fosfolipase A2 e hialuronidase (SILVA et al., 2012). Essas reações inflamatórias podem ser responsáveis pelo desencadeamento de doenças crônicas comuns, como artrite reumatóide, aterosclerose, fibrose pulmonar, reações alérgicas, diabetes tipo 2, desordens degenerativas e câncer (MÍLLAN-LINARES et al., 2014; YU et al., 2018).

A hialuronidase é uma enzima comum nos venenos de serpentes, escorpiões, abelhas, vespas, aranhas, lagartas e também são encontradas em secreções de vírus, fungos, bactérias e sanguessugas e podem agir como fator de espalhamento do veneno, levando a degradação do ácido hialurônico presente na matriz extracelular dos tecidos. As hialuronidases são divididas em três sub-grupos principais: (1) hialuronato-4-glucano hidrolase, (2) hialuronato-3-glucanohidrolase e (3) hialuronidase bacteriana. A hialuronidase (1) foi utilizada para o estudo de atividade anti-inflamatória neste trabalho e

estão presentes em testículos, lisossomos e em veneno de abelhas. São caracterizadas por atuarem na clivagem da ligação  $\beta$ -1,4-glicosídica do ácido hialurônico, liberando como principal produto, um tetrassacarídeo (BALA et al., 2018).

O ácido hialurônico, o principal substrato da hialuronidase, é um glicosaminoglicano, formado a partir de ligações repetidas de ácido  $\beta$ -D-glucurônico e N-acetil-glucosamina, que está presente nos tecidos conectivos da matriz extracelular e é importante para conectar as células do tecido conjuntivo, filamentos de proteínas e fibras de colágeno (MARCHESAN et al., 2006; BALA et al., 2018). Por meio da ação da hialuronidase, o ácido hialurônico é transformado em pequenos fragmentos, diminuindo a sua viscosidade e facilitando a proliferação celular entre os tecidos, levando a degradação da matriz extracelular. Este evento é essencial em muitos processos fisiológicos, como durante o desenvolvimento embrionário, crescimento e reparo dos tecidos, porém a degradação excessiva do ácido hialurônico pode ocasionar em doenças como artrite reumatoide, osteoartrite e doenças autoimunes (MARCHESAN et al., 2006). Além disso o aumento da permeabilidade dos tecidos, pode facilitar o acesso de patógenos envolvidos em processos inflamatórios, como *S. aureus* e *P. pneumoniae* (VASCONCELLOS, 2014).

Outro fator que leva a degradação da matriz extracelular é o envelhecimento da pele, que resulta em atrofia, redução de fibroblastos e afinamento dos vasos sanguíneos. Em consequência do envelhecimento da pele, decorrente da passagem do tempo ou de fatores externos, como exposição à radiação UV, fatores ambientais e hábitos alimentares, a síntese de colágeno e elastina diminuem e ainda pode ocorrer a formação de radicais livres, que por sua vez, também degradam a matriz extracelular (MALERICH & BERSON, 2014).

Alguns produtos cosméticos anti-idade contêm peptídeos em sua formulação (MALERICH & BERSON, 2014) por possuírem grande potencial no tratamento de inflamações cutâneas, com capacidade de regenerar a matriz extracelular, e também, aumentar a produção de colágeno (VASCONCELLOS, 2014). Peptídeos tem a capacidade funcional de alterar a fisiologia da pele, regulando a produção de fibroblastos de componentes da matriz extracelular, por meio da utilização de peptídeos sinalizadores, em que a introdução de fragmentos de proteínas como, por exemplo, elastina e colágeno, podem atuar como estimuladores induzindo a própria síntese (MALERICH & BERSON, 2014).

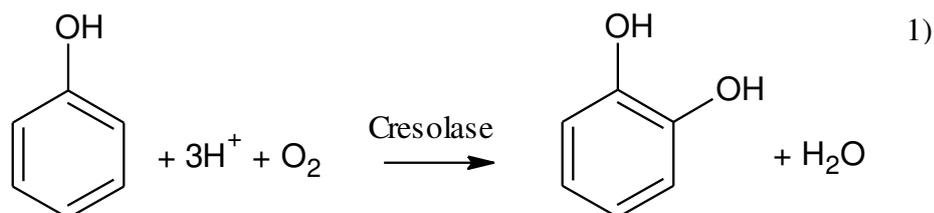
Em decorrência do processo de degradação da matriz extracelular, os fragmentos de ácido hialurônico, provenientes da ação da hialuronidase, são potentes

indutores de citocinas inflamatórias, que irão desencadear o processo inflamatório. No trabalho realizado por Hauser-Kawaguchi et al., (2017) foram sintetizados peptídeos bloqueadores da sinalização de fragmentos de ácido hialurônico, por meio da ligação dos peptídeos aos fragmentos.

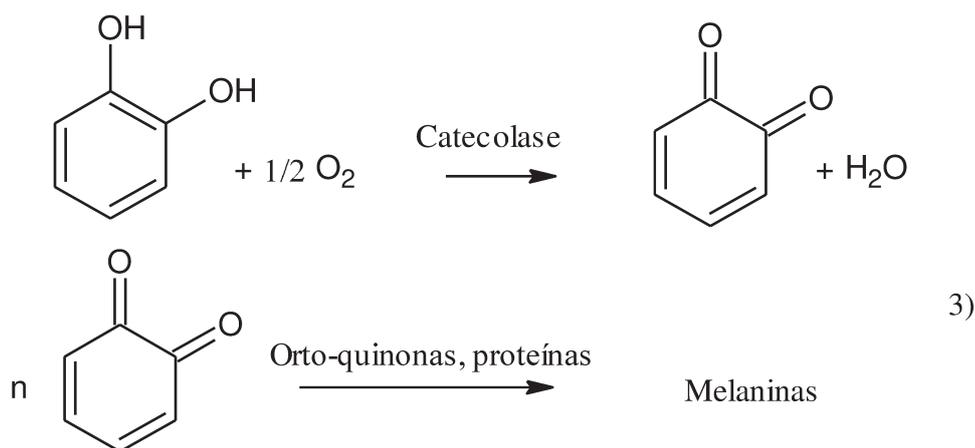
E ainda os peptídeos podem atuar competindo com a enzima hialuronidase para se ligar ao ácido hialurônico (substrato) e dessa maneira os peptídeos dificultam a formação do complexo enzima-substrato, impedindo a sua ação catalítica (LENORMAND et al., 2009; VASCONCELLOS, 2014).

### 3.3.4 - Inibição da enzima polifenoloxidase

Quando frutas e vegetais sofrem injúria física ou alterações fisiológicas (impactos, abrasões, injúria pelo frio, excesso de CO<sub>2</sub>) inicia-se o processo de escurecimento enzimático, pois essas lesões levam ao colapso celular e conseqüentemente a descompartimentação dessas células, promovendo o contato de compostos fenólicos com enzimas associadas ao escurecimento, principalmente, com a enzima polifenoloxidase (PFO) que em contato com o oxigênio molecular e compostos fenólicos catalisam reações de óxido-redução (SANTOS et al., 2012). Os compostos fenólicos presentes são hidroxilados formando orto-difenóis, os quais são oxidados a orto-quinonas, que são compostos instáveis e se condensam gerando pigmentos escuros e insolúveis de alta massa molecular, denominados melaninas (SANTOS, 2009). Além do escurecimento das frutas e vegetais, outras características podem ser afetadas, como a deterioração do aroma e também a diminuição do valor nutritivo dos alimentos, ocasionado pela reação das orto-quinonas com aminoácidos, peptídeos e proteínas, causando alterações estruturais e funcionais (BELLUZZO, 2008; SANTOS et al., 2012).



2)



**Figura 3** – Reações de escurecimento enzimático catalisada pela polifenoloxidase (1) e (2) e formação de melaninas (3).

Fonte: Adaptada de PERONE et al. (2009). As estruturas químicas foram obtidas com o auxílio do software ACD/ChemSketch versão 2015.2.5 (ACD LABS, Toronto, Canadá)

Devido aos efeitos deteriorativos, o controle do escurecimento enzimático torna-se crítico para a diminuição das perdas comerciais de frutas e vegetais (SILVA et al., 2009).

Sulfitos e seus derivados são eficazes na inibição da PFO, porém podem apresentar impactos negativos ao produto e ao consumidor, acarretando riscos toxicológicos e efeitos sensoriais indesejáveis ao produto (FAVERO, et al., 2011).

Geralmente são utilizados os ácidos ascórbico e cítrico em substituição aos sulfitos, mas sua eficácia é menor. Recentemente estudos com compostos sulfidril (ou tiol) mostraram bons resultados na inibição da PFO. Fontes naturais de proteínas e peptídeos, tais como, proteína do soro de leite, proteína da seda, proteína de trigo e proteína do farelo de arroz foram capazes de inibir a PFO (PUANGPHET et al., 2015).

Os inibidores de PFO podem ser classificados em dois grupos principais, de acordo com seu modo de ação: os inibidores de PFO, os quais atuam diretamente sobre as PFO, inibindo a formação das orto-quinonas e os agentes que atuam sobre as orto-quinonas, impedindo as reações não enzimáticas de polimerização, como a formação das melaninas (SILVA, 2017).

Peptídeos podem atuar como inibidores da enzima PFO, bem como na etapa de polimerização das orto-quinonas. Possivelmente os peptídeos podem atuar como inibidores competitivos das PFO, pois apresentam a capacidade de quelar íons  $Cu^{2+}$ , os quais estão

presentes no sítio ativo da enzima PFO e dessa forma poderiam bloquear a formação das orto-quinonas. Os peptídeos contendo resíduos de cisteína poderiam apresentar ação semelhante aos sulfitos e seus derivados, participando da estabilização das orto-quinonas, por meio de reações de adição nucleofílica ou de óxido-redução, impedindo a formação das melaninas (SILVA, 2017).

Peptídeos com resíduos de aminoácidos de histidina, fenilalanina, cisteína, triptofano, tirosina e arginina apresentaram alta capacidade de inibir a polifenoloxidase (PFO). A presença de resíduos de fenilalanina na cadeia peptídica, que apresenta uma estrutura semelhante à tirosina, que por sua vez é substrato da PFO, poderia causar uma inibição competitiva. Peptídeos contendo resíduos de cisteína e/ou fenilalanina apresentando também resíduos de aminoácidos apolares, como valina, alanina, leucina, histidina e triptofano, apresentaram maior inibição da PFO, pois a hidrofobicidade favorece a entrada dos peptídeos e bloqueio do sítio ativo da polifenoloxidase, que também é apolar (SILVA, 2017).

### **3.4 - Compostos interferentes**

Compostos fenólicos são metabólitos secundários de plantas, importantes para o crescimento e estão envolvidos nos sistemas de defesa contra a radiação ultravioleta e agressão por patógenos (PINTO, 2016). São classificados como substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, possuindo uma estrutura variável e englobando desde moléculas simples até moléculas com alto grau de polimerização (ANGELO & JORGE, 2007).

Em feijões comuns, os compostos fenólicos são encontrados no revestimento das sementes e em menores quantidades no cotilédone. A concentração desses compostos é influenciada por condições de crescimento e fatores genéticos (MOJICA et al., 2015).

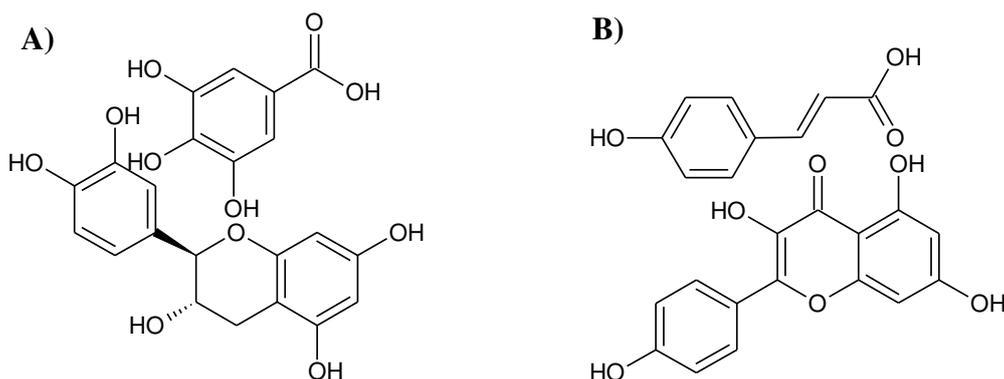
Os compostos fenólicos são divididos em subgrupos: ácidos fenólicos, flavonóides, taninos e estilbenos de acordo com o número de hidroxilas fenólicas ligadas e elementos estruturais que ligam os anéis de benzeno. Os ácidos fenólicos são divididos em dois subgrupos principais de acordo com sua estrutura: hidroxicinâmico e hidroxibenzóico (CÖMERT & GÖKMEN, 2018). Os flavonóides incluem os flavonóis, flavonas, flavanóis, flavononas, antocianidinas e iso-flavonas. Os taninos são divididos em taninos hidrolisáveis

e condensados e se apresentam na forma de complexos com polissacarídeos, proteínas e alcaloides (SINGH et al., 2017).

As antocianinas são membros da família dos flavonoides. Estão geralmente presentes nos tecidos vegetais na forma glicosilada. Taninos e antocianinas determinam a cor do revestimento da semente, quanto mais escuro o revestimento, maior a concentração desses compostos (MOJICA et al., 2015).

Compostos fenólicos no feijão podem incluir vários flavonóides, como antocianinas, flavonóis, proantocianidinas, taninos, glicosídeos, bem como uma ampla variedade de ácidos fenólicos (HAYAT et al., 2014; LOS et al., 2018). Os compostos que são geralmente encontrados em feijão comum são ácidos fenólicos como ácido gálico, vanílico, p-coumárico, ferúlico, sinápico e clorogênico e os flavonoides como catequina, kaempferol, quercetina, miricetina, procianidinas, e antocianinas, como a delfinidina-3-glucosídeo (HUBER, 2012; SINGH et al., 2017). Na Figura 4 são apresentadas algumas estruturas químicas dos compostos fenólicos presentes no feijão. Esses compostos também possuem atividades bioativas, apresentando capacidade de desativar radicar livres e também podem interagir com proteínas (SINGH et al., 2017).

Esses compostos estão presentes nos vegetais na forma livre ou ligados a açúcares (glicosídeos) e proteínas (ANGELO & JORGE, 2007) e por esse motivo também podem estar presentes na fração proteica, pois durante o processo de extração da fração proteica, os compostos fenólicos que se apresentam ligados às proteínas, podem ser carregados e conseqüentemente também estarão presentes no concentrado proteico. Na hidrólise enzimática das proteínas, esses compostos podem ser liberados, juntamente com os aminoácidos e peptídeos formados, e podem interferir na atividade antioxidante do hidrolisado, de forma sinérgica ou não (SILVA, 2012).



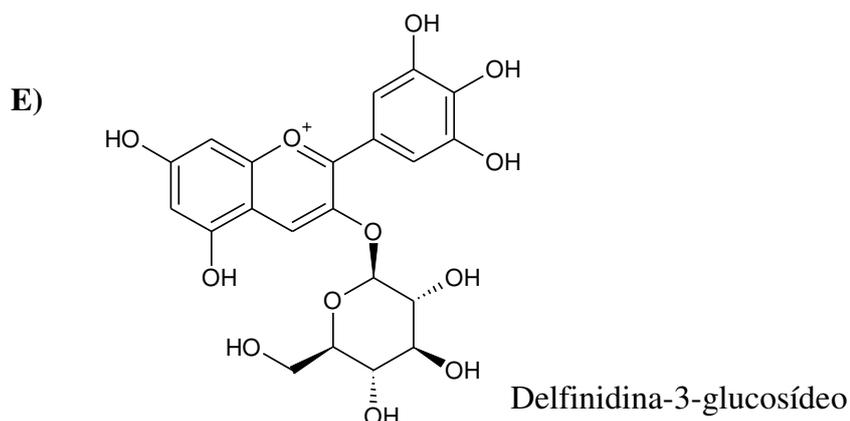
Ácido gálico

Ácido p-coumárico

C)

D)

Kaempferol



**Figura 4** – Exemplos de estruturas químicas de compostos fenólicos presentes em feijão comum: (A) Ácido gálico, (B) Ácido p-coumárico, (C) Catequina, (D) Kaempferol e (E) Delfinidina-3-glucosídeo.

Fonte: Adaptado de Huber (2012) e Singh et al. (2017). As estruturas químicas foram obtidas com o auxílio do banco de dados ChemSpider (<http://www.chemspider.com>) e do software ACD/ChemSketch versão 2015.2.5 (ACD LABS, Toronto, Canadá).

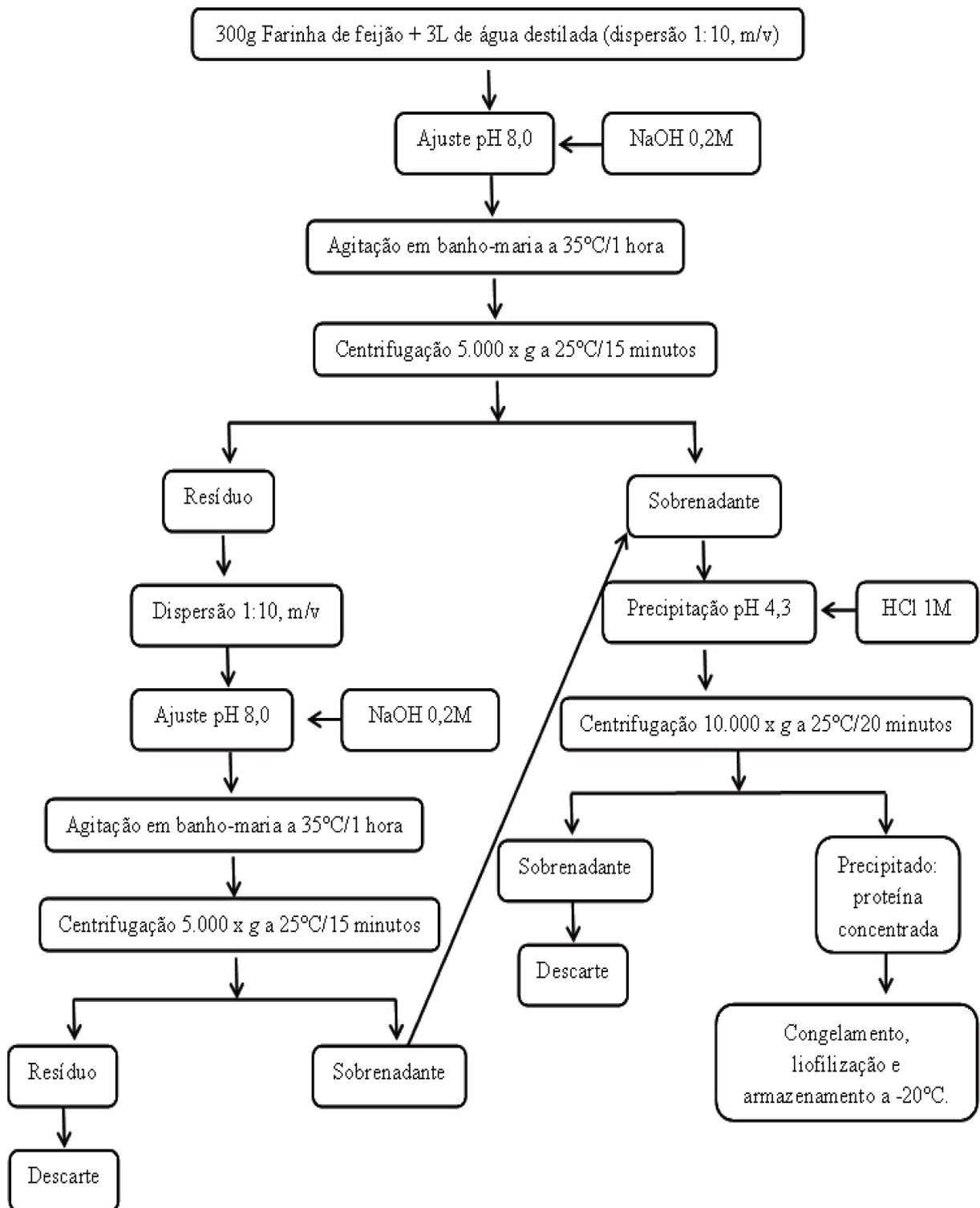
## 4 - MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 - Substratos e obtenção da proteína concentrada de feijão

As amostras de feijão carioca e de feijão vermelho foram adquiridas no comércio local (marcas Broto Legal e Urbano, respectivamente).

Os concentrados de proteína de feijão foram obtidos de acordo com o método descrito por Oseguera-Toledo et al., (2011). As amostras foram inicialmente trituradas em moinho de facas Marconi modelo MA 340 para obtenção de farinha. Amostras de trezentos gramas da farinha de feijão foram misturados com 3L de água destilada (Dispersão 1:10, m/v) e o pH foi ajustado para 8,0 com solução de NaOH 0,2M. As misturas foram mantidas sob agitação durante 1 hora a 35°C. As misturas foram centrifugadas a 5.000 x g por 15 minutos a 25°C e os sobrenadantes foram recolhidos. Os precipitados obtidos foram utilizados para uma segunda extração em condições semelhantes às descritas acima e os sobrenadantes obtidos da segunda extração foram combinados com os sobrenadantes recolhidos da primeira extração. As amostras de sobrenadante resultante foram ajustadas para pH 4,3 com solução de HCl 1M, centrifugadas a 10.000 x g por 20 minutos a 25°C e os precipitados de cada amostra foram utilizados como proteína concentrada de feijão.

As amostras de proteína concentrada de feijão foram congeladas, liofilizadas e armazenadas a -20°C para análises posteriores (Figura 5).



**Figura 5** – Fluxograma do processo de extração da proteína concentrada do feijão.

## **4.2 - Determinação do teor de proteínas**

O teor de proteínas dos concentrados proteicos de feijão foi avaliado pelo método de Lowry et al (1951), no qual foi utilizado albumina bovina como padrão.

## **4.3 - Obtenção dos hidrolisados de proteína concentrada de feijão**

### **4.3.1 - Proteases e determinação da atividade enzimática**

Três preparações comerciais de proteases microbianas, produzidas pela Novozymes, foram adquiridas da Sigma Aldrich. A preparação Flavourzyme<sup>®</sup> 500L de *Aspergillus oryzae* é um complexo de protease/peptidase que apresenta atividades de endoproteases e exopeptidases; a Alcalase<sup>®</sup> 2.4L de *Bacillus licheniformis*, é uma preparação de endoprotease do tipo serina; enquanto que a Neutrase<sup>®</sup> 0.8L de *Bacillus amyloliquefaciens* é uma metalo endo-protease (CASTRO, 2015; NOVOZYMES).

A atividade proteolítica foi determinada conforme a metodologia de Charney e Tomarelli (1947). Em microtubos de 2 mL foram adicionados 0,25 mL de solução 1% de azocaseína, 0,25 mL de solução tampão fosfato 100 mM pH 7 e 0,5 mL de solução enzimática. Os microtubos foram incubados a 50°C por 40 minutos. Após a incubação foi adicionado 0,5 mL de solução 10% de ácido tricloroacético para paralisação da reação e para o tubo controle (branco) foi adicionado 0,5 mL de solução 10% de ácido tricloroacético e em seguida 0,5 mL de solução enzimática. Os microtubos foram centrifugados a 10.000 x g a 25°C por 10 minutos e 1 mL do sobrenadante foi transferido para microtubos de 2 mL. Em seguida foi adicionado 1 mL de hidróxido de potássio (KOH) 5M e a absorbância foi medida a 428 nm, ajustando-se o zero da absorbância com água destilada.

Uma unidade de atividade proteolítica foi definida como a quantidade de enzima que produz aumento de 0,01 de absorbância por minuto de reação entre o branco reacional e a amostra nas condições de ensaio.

### **4.3.2 - Estudo da hidrólise enzimática da proteína concentrada de feijão, por planejamento experimental de misturas.**

As preparações de proteases comerciais Flavourzyme® 500L, Alcalase® 2.4L e Neutrase® 0.8L foram utilizadas para a obtenção de hidrolisados de proteína concentrada de feijão utilizando planejamento experimental de misturas conforme descrito por Castro (2015) com algumas modificações. Amostras de 5 g do concentrado proteico e protease (50 U por mL de mistura reacional) foram incubadas com 45 mL de tampão fosfato 100 mM, pH 7,0 a 50°C sob agitação de 100 rpm durante 2 horas. Após a hidrólise, as soluções foram submetidas a tratamento térmico (100°C por 20 minutos) para inativação das proteases. As amostras foram centrifugadas a 17.000 x g a 5°C por 20 minutos e os sobrenadantes contendo peptídeos foram coletados, congelados e liofilizados para determinação das atividades biológicas. O processo de hidrólise enzimática utilizando o planejamento experimental de misturas foi constituído de sete ensaios com componentes avaliados em 4 níveis: 1) 0 (0%), 2) 1/3 (33%), 3) 1/2 (50%) e 4) 1 (100%) como mostrado na Tabela 5.

**Tabela 5** – Matriz do planejamento experimental de misturas para obtenção de peptídeos bioativos por meio da hidrólise enzimática de proteína concentrada de feijão utilizando diferentes preparações enzimáticas de proteases.

Ensaio	Enzimas		
	Flavourzyme® 500L	Alcalase® 2.4 L	Neutrase® 0.8L
1	1	0	0
2	0	1	0
3	0	0	1
4	1/2	1/2	0
5	1/2	0	1/2
6	0	1/2	1/2
7	1/3	1/3	1/3

Todos os experimentos realizados foram analisados comparativamente com as suas respectivas amostras não hidrolisadas.

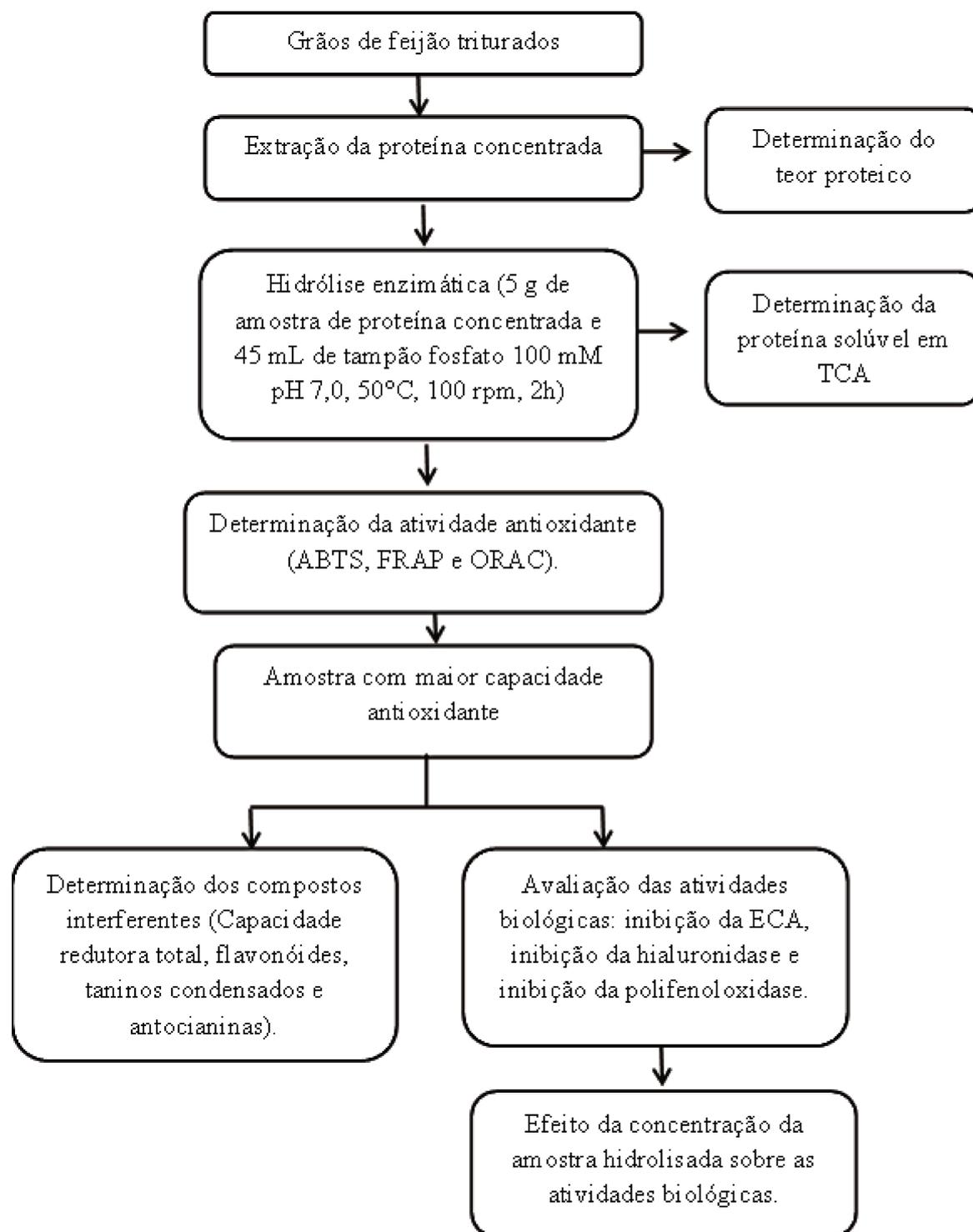
Equações quadráticas ou cúbicas foram utilizadas para definição de modelos para cada variável estudada, como na Equação 1.

$$Y_i = Y_i = \sum_{i=1}^q \beta_i X_i + \sum_{i < j}^q \beta_{ijk} X_i X_j + \sum_{i < j < k}^q \beta_{ijk} X_i X_j X_k \quad (\text{eq. 1})$$

Onde ‘Yi’ representa a resposta estimada pelo modelo, ‘q’ representa o número de componentes do sistema ‘Xi, Xj, Xk’ são as variáveis independentes codificadas, ‘βi’

representa os coeficientes de regressão linear para o efeito de cada termo, ' $\beta_{ij}$ ' e ' $\beta_{ijk}$ ' correspondem aos efeitos de interação entre as misturas binárias e ternárias. O coeficiente de correlação múltipla ( $R^2$ ) e o teste de Fisher (análise de variância – ANOVA) foram utilizados para verificar a adequação estatística dos modelos propostos codificados aos pontos reais. O software Statistica<sup>®</sup> 10 da Statsoft Inc. (Tulsa, Oklahoma, EUA) foi utilizado para o planejamento experimental, análise de dados e construção de modelos.

A amostra hidrolisada que apresentou maior atividade antioxidante foi selecionada para avaliação das demais atividades biológicas e também dos compostos interferentes que podem estar presentes nas amostras de hidrolisado proteico.



**Figura 6** – Fluxograma da preparação de hidrolisados de proteína de feijão e avaliação das atividades biológicas.

### **4.3.3 - Proteína solúvel em ácido tricloroacético**

O teor de proteína solúvel em ácido tricloroacético (TCA) dos hidrolisados e amostra controle foi determinado conforme Castro e Sato (2014). Em microtubos foi adicionado 1,0 mL dos hidrolisados ou controle (concentrado proteico sem tratamento enzimático) na concentração de 0,4 mg/mL e 1,0 mL de solução 0,44M de ácido tricloroacético (TCA). A mistura foi incubada durante 30 minutos a 25°C e em seguida centrifugada a 17.000 x g durante 15 minutos. As amostras de sobrenadante foram transferidas para microtubos de 2 mL e o teor de proteínas foi determinado pelo método de Lowry (1951) utilizando-se albumina de soro bovino como padrão. A razão entre o teor de proteína solúvel em TCA e o teor total de proteína nas amostras (sem TCA) foi determinada e expressa em porcentagem.

## **4.4 - Avaliação das atividades biológicas dos hidrolisados de proteína concentrada de feijão**

As amostras dos hidrolisados proteicos de feijão, assim como a amostra de concentrado proteico (controle) foram preparadas com água destilada e permaneceram em agitação a 150 rpm em agitador rotatório por 1 hora a 25°C e filtradas em papel de filtro.

### **4.4.1 - Atividade antioxidante**

#### **4.4.1.1 - Método da capacidade sequestradora do radical ABTS+**

A determinação da capacidade sequestradora do radical ABTS+ (2,2', azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) dos hidrolisados de proteína concentrada de feijão foi realizada de acordo com o método descrito por Sancho et al. (2015), com algumas modificações, o qual baseia-se na formação do radical ABTS+ pela reação com persulfato de potássio, em que a solução reagente final apresenta coloração verde-escura e verifica-se a capacidade dos peptídeos em estabilizar o radical ABTS+ formado, observando a diminuição da coloração da solução reacional em espectrofotômetro UV-Visível. Para a preparação do reagente ABTS, a mistura de 5 mL de solução 7mM de ABTS e 88 µL de

solução 140 mM de persulfato de potássio foi incubada por cerca de 16 horas no escuro e em seguida foi diluída até obter absorvância de  $0,7 \pm 0,05$  a 734 nm.

Para determinação da atividade antioxidante, alíquotas de 1,0 mL de solução reagente ABTS e 0,20 mL da amostra foram adicionadas em microtubos de 2 mL, em seguida os tubos foram incubados a 25°C por 6 minutos. Foi preparado tubo controle substituindo-se a amostra por água destilada, na mistura de reação. Após incubação a absorvância foi medida a 734 nm, ajustando-se o zero de absorvância com água destilada.

Foi preparada uma curva de calibração de Trolox e os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol}$  Trolox equivalente (TE)/ g de amostra.

#### **4.4.1.2 - Ensaio FRAP: método de redução de ferro**

Este ensaio baseia-se na medida direta da habilidade dos antioxidantes da amostra em reduzirem, em meio ácido, o complexo  $\text{Fe}^{+3}$ /tripiridiltriazina (TPTZ), para formar  $\text{Fe}^{+2}$ , de cor azul intensa e absorção máxima a 593 nm. A capacidade dos hidrolisados de proteína concentrada de feijão em reduzir o ferro III para ferro II foi realizada como descrito por Wiriyaphan, et al (2012). Em ambiente escuro, foram adicionados em microtubos de 2 mL, alíquota de 100  $\mu\text{L}$  do extrato da amostra e 1,0 mL de reagente FRAP (25 mL de solução tampão acetato 0,3M, pH 3,6; 2,5 mL de solução 10 mmol TPTZ em 40 mmol de HCl e 2,5 mL de solução de 20 mmol de cloreto férrico). Os microtubos foram agitados em vórtex e incubados a 37°C por 15 minutos. A absorvância foi medida em 593 nm. Para o controle, a amostra foi substituída por água destilada e o reagente FRAP foi utilizado como branco para a calibração do espectrofotômetro. Para a determinação da atividade antioxidante das amostras foi construída uma curva padrão de Trolox e os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol}$  Trolox equivalente (TE)/ g de amostra.

#### **4.4.1.3 - Determinação da capacidade antioxidante pelo ensaio ORAC**

O ensaio ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), foi realizado de acordo com o método descrito por Sancho et al (2015). A análise foi realizada em leitor de microplacas de 96 poços e as amostras e padrões Trolox foram preparados com tampão fosfato 75 mM pH 7,4. Em cada poço foi adicionado 20  $\mu\text{L}$  de extrato ou padrão Trolox,

120 µL de fluoresceína (70 mM) e 60 µL de solução AAPH (12 mM) para iniciar a reação. A decomposição da fluorescência foi medida a cada minuto durante 80 minutos a 37°C, com comprimentos de onda de excitação e emissão de 485 e 528 nm. Para o branco da reação a amostra e o Trolox foram substituídos pelo tampão. Os resultados foram calculados utilizando a área relativa sob a curva (AUC) para amostras comparadas com uma curva padrão de Trolox preparada nas mesmas condições experimentais. Os valores ORAC foram expressos como µmol TE / g de amostra.

A área sob a curva foi calculada de acordo com a Equação 2:

$$AUC = 1 + f_1/f_0 + \dots f_i/f_0 + \dots f_{80}/f_0 \quad (\text{eq. 2})$$

Onde  $f_0$  e  $f_i$  são representados pelas fluorescências obtidas nos tempos 0 e intermediários entre 0 e 80 minutos, respectivamente.

#### **4.4.1.4 – Efeito da concentração dos hidrolisados proteicos sobre as atividades biológicas**

O hidrolisado proteico que apresentou maior capacidade antioxidante foi selecionado e o efeito de diferentes concentrações da amostra foi avaliado nas atividades biológicas: anti-hipertensiva, anti-inflamatória e de inibição da polifenoloxidase. Os intervalos de concentração foram definidos de acordo com os resultados previamente obtidos para cada atividade biológica.

#### **4.4.2 – Inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA)**

A determinação da atividade anti-hipertensiva dos hidrolisados de proteína concentrada de feijão foi realizada em função da atividade inibitória da enzima conversora de angiotensina (ECA) de acordo com o método descrito por Siow e Gan (2013). Alíquotas de 50 µL das amostras (0,5 mg/ mL) foram misturadas com 50 µL de solução de ECA (50 mU/ mL) (Sigma Aldrich). As misturas reacionais foram incubadas a 37°C por 10 minutos para aclimação. Em seguida, foram adicionadas alíquotas de 150 µL do substrato hipuril-histidil-leucina (4,15 mM) (Sigma Aldrich) em tampão borato 0,05M contendo NaCl (0,3

M) pH 8,3 e as misturas reacionais foram incubadas a 37°C durante 30 minutos. A reação foi paralisada com a adição de 500 µL de HCl (1M). A extração de ácido hipúrico proveniente da ação da ECA sobre o substrato hipuril-histidil-leucina foi realizada pela adição de 1,5 mL de acetato de etila, agitação em vórtex por 1 minuto e repouso por 5 minutos. Alíquotas de 800 µL das amostras de acetato de etila contendo ácido hipúrico foram transferidas para microtubos de 2,0 mL e secos em estufa com circulação de ar a 80°C até evaporar todo o líquido. Após a secagem, o resíduo resultante foi solubilizado em 1,0 mL de água deionizada e agitado em vortex até completa dissolução. A concentração de ácido hipúrico foi estimada pela medida da absorbância em espectrofotômetro a 228 nm, ajustando-se o zero da absorbância com água deionizada. O tubo controle negativo foi preparado substituindo-se 50 µL de amostra por 50 µL de água destilada na mistura de reação. O potencial anti-hipertensivo das amostras foi expresso em função da inibição percentual da atividade de ECA como descrito na Equação 3:

$$\text{Inibição ECA (\%)} = \frac{(\text{Abs}_{\text{CN}} - \text{Abs}_{\text{A}})}{\text{Abs}_{\text{CN}}} \times 100 \quad (\text{eq. 3})$$

Onde  $\text{Abs}_{\text{CN}}$  é a absorbância do controle negativo e  $\text{Abs}_{\text{A}}$ , a absorbância das amostras.

#### 4.4.3 – Inibição da enzima hialuronidase (HIA)

A inibição da enzima hialuronidase dos hidrolisados de proteína concentrada do feijão foi determinada de acordo com Silva et al (2012), Vasconcellos (2014) e Wiem et al (2014). Em tubos de ensaio foram adicionados 50 µL das soluções de proteína concentrada de feijão e 50 µL (350 unidades) de solução da enzima hialuronidase (HIA) (Tipo IV-S de testículos bovinos, Sigma Co.) na concentração de 6,5 mg/mL dissolvida em tampão acetato 0,1M, pH 3,6 e foram incubados a 37°C por 20 minutos. Em seguida foi adicionado 50 µL de solução 12,5 mM de cloreto de cálcio e os tubos foram incubados a 37°C por mais 20 minutos. Após esse período, foram adicionados 250 µL de solução do substrato ácido hialurônico (AH) na concentração 1,2 mg/mL em tampão acetato 0,1M, pH 3,6 e as amostras foram incubadas a 37°C por 40 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 50 µL de solução 0,4M de NaOH e 100 µL de solução 0,2M de borato de sódio e os tubos

foram aquecidos em banho de ebulição por 3 minutos. Posteriormente, os tubos foram resfriados a 25°C e foi adicionado 1,5 mL de solução 10% de p-dimetilaminobenzaldeído dissolvido em ácido acético glacial (contendo 12,5 % de ácido clorídrico 10 N) e os tubos foram incubados novamente à 37°C por 20 minutos.

Para o controle negativo foi utilizado água destilada em substituição as amostras na mistura reacional. As leituras de absorvância foram medidas em espectrofotômetro a 585 nm, ajustando-se o zero de absorvância com água destilada. Os testes foram realizados em triplicatas. A atividade anti-inflamatória foi mensurada pela porcentagem de inibição da enzima hialuronidase (HIA) conforme Equação 4.

$$\text{Inibição HIA (\%)} = \frac{(\text{Abs}_{\text{CN}} - \text{Abs}_{\text{A}})}{\text{Abs}_{\text{CN}}} \times 100 \quad (\text{eq. 4})$$

Onde  $\text{Abs}_{\text{CN}}$  é a absorvância do controle negativo e  $\text{Abs}_{\text{A}}$ , a absorvância das amostras.

#### 4.4.4 - Inibição da polifenoloxidase (PFO)

A atividade da PFO foi determinada por método colorimétrico, utilizando catecol como substrato e a absorvância foi monitorada em espectrofotômetro a 420 nm segundo a metodologia de Puangphet et al (2015) e Sukhonthara et al (2016) com algumas modificações. Foram utilizados extratos brutos de PFO de maçã gala e pêra willians para os estudos de efeito de peptídeos de hidrolisados proteicos de feijão na inibição da PFO. Amostras de 100g de frutos e 100 mL de tampão fosfato 0,1M pH 6,0 contendo 1% de PVP (polivinilpirrolidona) foram homogeneizados em liquidificador, filtradas em algodão hidrofílico, centrifugadas a 10.000 x g a 4°C por 15 minutos e os sobrenadantes foram utilizados como extratos brutos de PFO. Para a determinação de atividade de PFO a absorvância da mistura reacional de 1 mL de catecol 0,175M em tampão fosfato 0,1M pH 6,0, 1,9 mL de tampão fosfato 0,1M pH 6,0 e 0,1 mL do extrato enzimático de PFO foi monitorada durante 5 minutos a 420 nm.

Para o estudo de inibição da PFO a mistura de 1 mL de extrato de proteína hidrolisada de feijão (1,0 a 6,0 mg/mL), 0,1 mL de extrato enzimático de PFO e 0,9 mL de tampão fosfato 0,1M pH 6,0 foi incubada a 25°C por 5 minutos. Em seguida foi adicionado 1 mL de substrato catecol 0,175M em tampão fosfato 0,1M pH 6,0 e o aumento da

absorbância a 420 nm foi medido durante 5 minutos. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que causa o aumento de 0,001 a 420 nm por minuto/ g de enzima. O espectrofotômetro foi calibrado com tampão fosfato 0,1M pH 6,0 e foram utilizados dois controles, o primeiro com 2 mL de tampão fosfato 0,1M pH 6,0 e 1 mL de catecol 0,175M em tampão fosfato 0,1M pH 6,0 e o segundo com 2,9 mL de tampão fosfato 0,1M pH 6,0 e 0,1 mL de extrato enzimático afim de eliminar a interferência da alteração de cor do substrato catecol e da enzima com o tempo de incubação.

A inibição de PFO foi calculada conforme a Equação 5:

$$\text{Inibição PFO (\%)} = 1 - \frac{\text{Atividade PFO com inibidor}}{\text{Atividade PFO sem inibidor}} \times 100 \quad (\text{eq. 5})$$

#### **4.5 - Determinação do teor de compostos interferentes**

Os concentrados de proteínas de feijão carioca e vermelho, como também as respectivas amostras hidrolisadas com maior capacidade antioxidante foram avaliadas quanto ao seu teor de compostos fenólicos totais, flavonoides, taninos condensados e antocianinas monoméricas para verificação da presença de compostos antioxidantes.

##### **4.5.1 – Capacidade redutora total**

Os compostos fenólicos totais foram determinados como descrito por Roesler et al. (2007), sendo tratados como capacidade redutora total pelo fato de proteínas e também açúcares reagirem com o reagente de Folin-Ciocalteu. Foram preparados extratos aquosos das amostras hidrolisadas de proteína concentrada de feijão carioca e vermelho e seus respectivos controles. Tubos de ensaio contendo 0,5 mL de cada extrato, 2,5 mL de solução 10% (v/v) de reagente de Folin-Ciocalteu e 2,0 mL de solução 7,5% (m/v) de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> foram incubados a 50°C por 5 minutos. Para o tubo branco da reação, os extratos foram substituídos por água destilada e as absorbâncias foram medidas a 760 nm. A quantificação foi realizada com uma curva de calibração do ácido gálico (10 – 100 µg / mL) e os resultados foram expressos em mg de ácido gálico equivalente (GAE)/g de amostra.

##### **4.5.2 - Flavonóides totais**

A determinação do teor de flavonoides totais foi realizada conforme descrito por Zhishen et al. (1999). Foram preparados extratos aquosos das amostras hidrolisadas de proteína concentrada de feijão carioca e vermelho e seus respectivos controles. Tubos de ensaio, contendo 2,5 mL de água destilada, 500  $\mu$ L de cada extrato e 150  $\mu$ L de solução 5% (m/v) de nitrito de sódio, foram incubados em temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida foi adicionado 150  $\mu$ L de solução 10% (m/v) de cloreto de alumínio. Após 6 minutos em temperatura ambiente foi adicionado 1 mL de solução 4% (m/v) de NaOH e 1,2 mL de água destilada e a absorbância foi medida a 510 nm.

Para o tubo branco da reação, os extratos foram substituídos por água destilada. Foi preparada uma curva de calibração de catequina (10 – 175  $\mu$ g / mL) e os resultados foram expressos em mg de catequina equivalente (CE)/g de amostra.

#### **4.5.3 - Taninos condensados**

Os taninos condensados foram determinados de acordo com o método descrito por Julkunen-Titto (1985) com algumas modificações. Foram preparados extratos aquosos das amostras hidrolisadas de proteína concentrada de feijão carioca e vermelho e seus respectivos controles. Microtubos de 2 mL, contendo 30 $\mu$ L de cada extrato, 900  $\mu$ L de solução 4% (m/v) de vanilina e 450  $\mu$ L de HCl concentrado (P.A.) foram incubados a 30°C por 20 minutos. Para o tubo controle (branco) os extratos foram substituídos por água destilada e as absorbâncias foram medidas a 500 nm. Foi preparada uma curva de calibração de catequina (50 – 800  $\mu$ g / mL) e os resultados foram expressos em mg de catequina equivalente (CE)/g de amostra.

#### **4.5.4 - Antocianinas monoméricas**

A quantificação de antocianinas monoméricas foi determinada pelo método de diferencial de pH, conforme Giusti & Wrolstad (2001). Foram preparados extratos das amostras hidrolisadas de proteína concentrada de feijão carioca e vermelho e seus respectivos controles diluídos em tampão cloreto de potássio 0,025M pH 1,0 e tampão de acetato de sódio 0,4M pH 4,5. As amostras foram incubadas por 30 minutos a 25°C. Em

seguida, as absorvâncias das amostras em pH 1,0 e pH 4,5 foram medidas em 510 nm e 700 nm. As antocianinas monoméricas foram expressas em mg equivalente de cianidina 3 – glicosídeo (EGC)/g de amostra, considerando a massa molecular de 449,2 g/mol e o coeficiente de absorção molar ( $\epsilon$ ) de 26.900 L/mol cm e calculada conforme Equação 6.

$$AM \text{ (mg/L)} = \frac{[(A_{510}-A_{700})_{pH1} - (A_{510}-A_{700})_{pH4,5}] \times MM \times FD \times 10^3}{\epsilon \times l} \quad (\text{eq. 6})$$

Onde MM é a massa molecular, FD o fator de diluição da amostra e  $\epsilon$  o coeficiente de absorção molar.

## **5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1 - Extração e determinação do teor da proteína concentrada de feijão.**

O rendimento da extração de proteínas de feijão vermelho e carioca foram respectivamente 34,75% e 41% (m / m). As amostras de proteína concentrada de feijão vermelho e carioca apresentaram 87,13% e 90,62% de proteína respectivamente.

Os valores obtidos de rendimento de extração e teor do concentrado proteico do feijão carioca e feijão vermelho foram superiores aos valores obtidos por Evangelho et al (2017) com o feijão preto, com rendimento de 21,7% e teor proteico de 81,6%.

## 5.2 - Planejamento experimental de misturas e hidrólise enzimática

As preparações de proteases comerciais Flavourzyme® 500L, Alcalase® 2.4L e Neutrase® 0.8L apresentaram valores de atividade enzimática iguais a 26.043 U mL<sup>-1</sup>, 513.600 U mL<sup>-1</sup> e 61.963 U mL<sup>-1</sup> respectivamente, em pH 7,0 e a 50°C. A concentração das proteases para a hidrólise da proteína concentrada de feijão foi ajustada para 50 U mL<sup>-1</sup> conforme planejamento experimental de misturas.

O valor de porcentagem de proteína solúvel em ácido tricloroacético (TCA) foi utilizado como uma medida indireta do grau de hidrólise das proteínas utilizando proteases.

A Tabela 6 ilustra que a amostra do ensaio 4 de proteína hidrolisada de feijão carioca (½ Flavourzyme® e ½ Alcalase®) e as amostras dos ensaios 4 (½ Flavourzyme® e ½ Alcalase®) e 7 (⅓ Flavourzyme®, ⅓ Alcalase® e ⅓ Neutrase®) de proteína hidrolisada de feijão vermelho apresentaram maiores teores de proteína solúvel em TCA, 79,35% ± 1,78; 70,81% ± 1,40 e 71,30% ± 2,43, respectivamente. As amostras controle de proteína concentrada de feijão carioca e vermelho, que não foram tratadas com proteases, apresentaram 12,61% e 11,97% de proteínas solúveis em TCA, respectivamente.

Castro e Sato (2014) estudaram a hidrólise enzimática com Flavourzyme® em pH 5,0, 50°C, concentração de proteína de 100 mg/mL e 120 minutos de reação, utilizando diferentes fontes proteicas (soja, soro bovino e ovo). O hidrolisado proteico de soja apresentou proteína solúvel em TCA igual a 62,47% e o seu controle 30,70%, a proteína hidrolisada de soro bovino apresentou 56,70% e o controle 37,24% e o hidrolisado proteico do ovo obteve 63,79% de proteína solúvel no TCA e o controle de 16,42%. Em comparação com resultados obtidos com os hidrolisados proteicos de feijão carioca e vermelho, foram observados teores de proteína solúvel no TCA mais baixos com a aplicação de

Flavourzyme® de forma isolada (ensaio 1), porém com a sinergia das enzimas, incluindo também Alcalase® e Neutrase® foram obtidos valores mais altos (ensaios 4 e 7).

**Tabela 6** – Porcentagem de proteína solúvel em TCA das amostras do planejamento experimental de misturas\*.

Ensaio	Proteína solúvel no TCA (%)	
	Feijão carioca	Feijão vermelho
Controle	12,61 ± 0,64 <sup>A,f</sup>	11,97 ± 0,10 <sup>A,f</sup>
1	24,03 ± 1,20 <sup>A,e</sup>	18,94 ± 1,50 <sup>B,e</sup>
2	30,17 ± 1,42 <sup>A,d</sup>	31,99 ± 1,25 <sup>A,c</sup>
3	27,24 ± 0,93 <sup>B,d</sup>	30,62 ± 0,34 <sup>A,c</sup>
4	79,35 ± 1,78 <sup>A,a</sup>	70,81 ± 1,40 <sup>B,a</sup>
5	22,03 ± 0,88 <sup>A,e</sup>	22,80 ± 0,52 <sup>A,d</sup>
6	41,52 ± 1,83 <sup>A,c</sup>	39,53 ± 0,35 <sup>A,b</sup>
7	64,28 ± 1,13 <sup>B,b</sup>	71,30 ± 2,43 <sup>A,a</sup>

\*Os resultados são apresentados como a média (n = 3) ± DP, e aqueles com letras maiúsculas diferentes na mesma linha são significativamente diferentes, com p <0,05 e resultados com letras minúsculas diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes, com p <0,05.

### 5.3 - Avaliação da capacidade antioxidante dos hidrolisados proteicos

A capacidade antioxidante das amostras hidrolisadas foi avaliada pelos métodos de captura de radical ABTS, ensaio FRAP e ORAC. A atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos de feijão carioca (Tabela 7) e vermelho (Tabela 8), determinados pelos três métodos, foram superiores aos valores de atividade antioxidante das amostras controle (sem tratamento enzimático). Os valores de atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos de feijão carioca variaram de 67,13 µmol TE/g (controle) a 113,91 µmol TE/g (amostra 7) para o método ABTS, 10,41 µmol TE/g (controle) a 28,36 µmol TE/g no ensaio FRAP (amostra 4) e para o ORAC a variação foi de 117,30 µmol TE/g (controle) a 825,20 µmol TE/g (amostra 7).

Os hidrolisados proteicos de feijão vermelho apresentaram valores de atividade antioxidante com uma menor variação entre as amostras hidrolisadas e controle quando comparados aos valores apresentados pelas amostras de hidrolisados proteicos de feijão carioca. Os resultados de atividade antioxidante para as amostras de hidrolisados proteicos de feijão vermelho variaram de 44,64 µmol TE/g (controle) a 71,19 µmol TE/g (amostra 7)

para o método ABTS, 15,42  $\mu\text{mol TE/g}$  (controle) a 32,72  $\mu\text{mol TE/g}$  (amostra 5) para o ensaio FRAP e 167,46  $\mu\text{mol TE/g}$  (controle) a 620,44  $\mu\text{mol TE/g}$  (amostra 4) para o ORAC.

**Tabela 7** – Atividades antioxidantes dos hidrolisados proteicos de feijão carioca, obtidos por meio de planejamento experimental de misturas\*.

<b>Ensaio</b>	<b>Captura de radical ABTS (<math>\mu\text{mol TE/g}</math>)</b>	<b>FRAP (<math>\mu\text{mol TE/g}</math>)</b>	<b>ORAC (<math>\mu\text{mol TE/g}</math>)</b>
Controle	67,13 $\pm$ 0,54 <sup>f</sup>	10,41 $\pm$ 0,02 <sup>g</sup>	117,30 $\pm$ 7,46 <sup>e</sup>
1	95,73 $\pm$ 0,48 <sup>d</sup>	27,85 $\pm$ 0,06 <sup>b</sup>	476,80 $\pm$ 26,12 <sup>c</sup>
2	91,09 $\pm$ 1,13 <sup>e</sup>	23,94 $\pm$ 0,28 <sup>e</sup>	350,40 $\pm$ 22,66 <sup>d</sup>
3	91,88 $\pm$ 0,64 <sup>e</sup>	21,36 $\pm$ 0,14 <sup>f</sup>	352,37 $\pm$ 4,86 <sup>d</sup>
4	111,54 $\pm$ 0,36 <sup>b</sup>	28,36 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	643,30 $\pm$ 6,55 <sup>b</sup>
5	94,66 $\pm$ 0,93 <sup>d</sup>	26,79 $\pm$ 0,17 <sup>c</sup>	478,00 $\pm$ 17,59 <sup>c</sup>
6	108,56 $\pm$ 0,31 <sup>c</sup>	25,98 $\pm$ 0,21 <sup>d</sup>	661,20 $\pm$ 8,78 <sup>b</sup>
7	113,91 $\pm$ 0,57 <sup>a</sup>	27,90 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	825,20 $\pm$ 14,04 <sup>a</sup>

\*Os resultados são apresentados como a média (n = 3)  $\pm$  DP, e aqueles com letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes, com p < 0,05 pelo Teste de *Tukey*.

**Tabela 8** - Atividades antioxidantes dos hidrolisados proteicos de feijão vermelho, obtidos por meio de planejamento experimental de misturas\*.

<b>Ensaio</b>	<b>Captura de radical ABTS (<math>\mu\text{mol TE/g}</math>)</b>	<b>FRAP (<math>\mu\text{mol TE/g}</math>)</b>	<b>ORAC (<math>\mu\text{mol TE/g}</math>)</b>
Controle	44,64 $\pm$ 0,60 <sup>f</sup>	15,42 $\pm$ 0,12 <sup>f</sup>	167,46 $\pm$ 1,88 <sup>e</sup>
1	60,43 $\pm$ 0,44 <sup>e</sup>	27,64 $\pm$ 0,03 <sup>d</sup>	555,00 $\pm$ 8,17 <sup>c</sup>
2	63,32 $\pm$ 0,75 <sup>d</sup>	29,33 $\pm$ 0,27 <sup>c</sup>	487,86 $\pm$ 18,66 <sup>d</sup>
3	63,10 $\pm$ 0,66 <sup>d</sup>	30,01 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>	500,87 $\pm$ 4,38 <sup>d</sup>

4	68,14 ± 0,26 <sup>b</sup>	27,44 ± 0,22 <sup>d</sup>	620,44 ± 2,69 <sup>a</sup>
5	66,60 ± 0,32 <sup>c</sup>	32,72 ± 0,05 <sup>a</sup>	567,90 ± 30,54 <sup>b,c</sup>
6	68,83 ± 0,32 <sup>b</sup>	29,52 ± 0,05 <sup>c</sup>	597,96 ± 12,65 <sup>a,b,c</sup>
7	71,19 ± 0,17 <sup>a</sup>	26,20 ± 0,05 <sup>e</sup>	608,07 ± 18,45 <sup>a,b</sup>

\*Os resultados são apresentados como a média (n = 3) ± DP, e aqueles com letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes, com p <0,05 pelo Teste de *Tukey*.

Nas Tabelas 7 e 8 é possível observar uma correlação entre a proteína solúvel em TCA e a atividade antioxidante, em que de maneira geral, os ensaios 4 e 7 apresentaram maiores valores de atividade antioxidante e também maiores teores de proteína solúvel em TCA.

Uma hidrólise com maior formação de peptídeos curtos pode apresentar um potencial biológico mais significativo, pois peptídeos menores podem apresentar maior estabilidade e resistência nas condições do trato gastrointestinal, e também seriam mais facilmente transportados por seus precursores específicos. Porém também existem estudos indicando que a hidrólise mais extensiva na cadeia proteica pode influenciar de maneira negativa as atividades biológicas dos peptídeos, dependendo das enzimas utilizadas, dos peptídeos formados e aminoácidos presentes nas extremidades (SAADI et al., 2015).

Após a hidrólise enzimática, além da liberação de peptídeos, pode ocorrer também a liberação de compostos fenólicos que estavam presentes ligados às proteínas. Portanto, a atividade antioxidante de matrizes derivadas de plantas pode estar associada aos peptídeos e também aos compostos fenólicos e seus complexos, podendo agir de maneira sinérgica (SILVA et al., 2017).

#### **5.4 - Avaliação estatística do planejamento experimental de misturas**

A partir dos valores experimentais obtidos nas análises de atividade antioxidante, foram gerados modelos quadráticos ou cúbicos, um para cada resposta (ABTS, FRAP e ORAC). Os coeficientes de regressão foram calculados e avaliados por análise de variância (ANOVA). Nas Tabelas 9, 10 e 11 são apresentados os coeficientes de regressão (efeitos), para as respostas de atividade antioxidante das amostras de proteína

hidrolisada de feijão carioca analisada pelos métodos ABTS, FRAP e ORAC, respectivamente.

Os coeficientes de regressão linear e as interações binárias e ternárias gerados pelo método ABTS (Tabela 9) foram significativos com  $p \leq 0,05$ , com a exceção da interação binária Flavourzyme® e Alcalase® ( $p = 0,146$ ). Já para os coeficientes apresentados pelo método FRAP (Tabela 10), a interação ternária de Flavourzyme®, Alcalase® e Neutrase® não foi significativa com  $p = 0,759$  e na avaliação dos coeficientes pelo método ORAC (Tabela 11), tanto as enzimas de forma isolada, como também as interações binárias e ternárias foram significativas com  $p \leq 0,05$ .

**Tabela 9** – Coeficientes de regressão para a capacidade antioxidante avaliada pelo método ABTS para a proteína hidrolisada de feijão carioca.

<b>Fator</b>	<b>Coefficiente</b>	<b>Erro padrão</b>	<b>t(14)</b>	<b>P-valor</b>
<b>Flavourzyme®</b>	95,73	0,45	212,5 3	0,000
<b>Alcalase®</b>	91,09	0,45	202,2 4	0,000
<b>Neutrase®</b>	91,88	0,45	204,0 0	0,000
<b>Flavourzyme® x Alcalase®</b>	73,58	2,21	33,35	0,000
<b>Flavourzyme® x Neutrase®</b>	3,40	2,21	1,54	0,146
<b>Alcalase® x Neutrase®</b>	68,29	2,21	30,95	0,000
<b>Flavourzyme® x Alcalase® x Neutrase®</b>	120,00	15,52	7,73	0,000

**Tabela 10** - Coeficientes de regressão para a capacidade antioxidante avaliada pelo método FRAP para a proteína hidrolisada de feijão carioca.

<b>Fator</b>	<b>Coefficiente</b>	<b>Erro padrão</b>	<b>t(14)</b>	<b>P-valor</b>
--------------	---------------------	--------------------	--------------	----------------

<b>Flavourzyme®</b>	27,85	0,09	303,7 6	0,000
<b>Alcalase®</b>	23,94	0,09	261,0 9	0,000
<b>Neutrase®</b>	21,36	0,09	232,9 4	0,000
<b>Flavourzyme® x Alcalase®</b>	9,87	0,45	21,97	0,000
<b>Flavourzyme® x Neutrase®</b>	8,75	0,45	19,48	0,000
<b>Alcalase® x Neutrase®</b>	13,33	0,45	29,67	0,000
<b>Flavourzyme® x Alcalase® x Neutrase®</b>	-0,99	3,16	-0,31	0,759

**Tabela 11** - Coeficientes de regressão para a capacidade antioxidante avaliada pelo método ORAC para a proteína hidrolisada de feijão carioca.

<b>Fator</b>	<b>Coefficiente</b>	<b>Erro padrão</b>	<b>t(14)</b>	<b>p-valor</b>
<b>Flavourzyme®</b>	476,80	9,37	50,87	0,000
<b>Alcalase®</b>	350,40	9,37	37,38	0,000
<b>Neutrase®</b>	352,37	9,37	37,59	0,000
<b>Flavourzyme® x Alcalase®</b>	918,80	45,92	20,01	0,000
<b>Flavourzyme® x Neutrase®</b>	253,67	45,92	5,52	0,000
<b>Alcalase® x Neutrase®</b>	1239,27	45,92	26,99	0,000
<b>Flavourzyme® x Alcalase® x Neutrase®</b>	4429,10	323,07	13,71	0,000

Nas Tabelas 12, 13 e 14 são apresentados os coeficientes de regressão (efeitos), para as respostas de atividade antioxidante de proteína hidrolisada de feijão vermelho.

**Tabela 12** - Coeficientes de regressão para a capacidade antioxidante avaliada pelo método ABTS para a proteína hidrolisada de feijão vermelho.

<b>Fator</b>	<b>Coefficiente</b>	<b>Erro padrão</b>	<b>t(14)</b>	<b>P-valor</b>
<b>Flavourzyme®</b>	60,43	0,27	226,8 7	0,000
<b>Alcalase®</b>	63,32	0,27	237,7 2	0,000
<b>Neutrase®</b>	63,10	0,27	236,8 8	0,000
<b>Flavourzyme® x Alcalase®</b>	25,04	1,30	19,19	0,000
<b>Flavourzyme® x Neutrase®</b>	19,33	1,30	14,82	0,000
<b>Alcalase® x Neutrase®</b>	22,47	1,30	17,22	0,000
<b>Flavourzyme® x Alcalase® x Neutrase®</b>	39,87	9,18	4,34	0,001

**Tabela 13** - Coeficientes de regressão para a capacidade antioxidante avaliada pelo método FRAP para a proteína hidrolisada de feijão vermelho.

<b>Fator</b>	<b>Coefficiente</b>	<b>Erro padrão</b>	<b>t(14)</b>	<b>P-valor</b>
<b>Flavourzyme®</b>	27,64	0,08	349,8 5	0,000
<b>Alcalase®</b>	29,33	0,08	371,2 4	0,000
<b>Neutrase®</b>	30,01	0,08	379,8 3	0,000
<b>Flavourzyme® x Alcalase®</b>	-4,18	0,39	-10,79	0,000
<b>Flavourzyme® x Neutrase®</b>	15,61	0,39	40,33	0,000
<b>Alcalase® x Neutrase®</b>	-0,58	0,39	-1,50	0,157
<b>Flavourzyme® x Alcalase® x Neutrase®</b>	-107,78	2,72	-39,58	0,000

**Tabela 14** - Coeficientes de regressão para a capacidade antioxidante avaliada pelo método ORAC para a proteína hidrolisada de feijão vermelho.

<b>Fator</b>	<b>Coefficiente</b>	<b>Erro padrão</b>	<b>t(14)</b>	<b>p-valor</b>
<b>Flavourzyme®</b>	555,00	9,44	58,81	0,000

<b>Alcalase®</b>	487,80	9,44	51,69	0,000
<b>Neutrase®</b>	500,83	9,44	53,07	0,000
<b>Flavourzyme® x Alcalase®</b>	396,13	46,23	8,57	0,000
<b>Flavourzyme® x Neutrase®</b>	160,07	46,23	3,46	0,004
<b>Alcalase® x Neutrase®</b>	414,73	46,23	8,97	0,000
<b>Flavourzyme® x Alcalase® x Neutrase®</b>	-387,70	325,26	-1,19	0,253

Os coeficientes de regressão linear e as interações binárias e ternárias obtidos a partir das respostas antioxidantes avaliadas pelo método ABTS (Tabela 12) mostraram valores significativos com  $p \leq 0,05$  e os coeficientes apresentados pelo método FRAP (Tabela 13), a interação binária de Alcalase® e Neutrase® não foi significativa com  $p = 0,157$  e na avaliação dos coeficientes pelo método ORAC (Tabela 14), a interação ternária de Flavourzyme®, Alcalase® e Neutrase® não foi significativa, com  $p = 0,253$ .

O coeficiente de correlação múltipla ( $R^2$ ) e o teste de Fisher (análise de variância – ANOVA) foram utilizados para verificar a adequação estatística dos modelos propostos codificados aos pontos reais (experimentais). Nas Tabelas 15 e 16 estão apresentados os modelos gerados para cada variável resposta, as equações para cada modelo e também os valores de F-calculado,  $R^2$  e p-valor para as amostras de hidrolisados proteicos de feijão carioca e vermelho.

**Tabela 15** - Análise de variância (ANOVA) incluindo modelos,  $R^2$  e valores de probabilidade para os modelos reduzidos finais para atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos de feijão carioca.

<b>Resposta</b>	<b>Modelo</b>	<b>Equação</b>	<b>F-calculado</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>p-valor</b>
<b>Captura de radical ABTS (µmol TE/g)</b>	Especial cúbico	$Y = 96,01x_1 + 91,09x_2 + 92,17x_3 + 73,02x_1x_2 + 67,72x_2x_3 + 128,50x_1x_2x_3$	522,56	0,99	< 0,001
<b>FRAP (µmol TE/g)</b>	Quadrático	$Y = 27,85x_1 + 23,94x_2 + 21,36x_3 + 9,82x_1x_2 + 8,70x_1x_3 + 13,28x_2x_3$	987,66	0,99	< 0,001

<b>ORAC</b> ( $\mu\text{mol TE/g}$ )	Especial cúbico	$Y = 476,80x_1 + 350,40x_2 + 352,37x_3 + 918,80x_1x_2 + 1239,27x_2x_3 + 4429,10,4x_1x_2x_3$	352,25	0,99	< 0,001
---	--------------------	---	--------	------	---------

Os valores codificados nas equações representam os componentes da mistura e suas interações:  $x_1$  = Flavourzyme® 500L;  $x_2$  = Alcalase® 2.4L e  $x_3$  = Neutrase® 0.8L

**Tabela 16** - Análise de variância (ANOVA) incluindo modelos,  $R^2$  e valores de probabilidade para os modelos reduzidos finais para atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos de feijão vermelho.

Resposta	Modelo	Equação	F-calculado	$R^2$	p-valor
<b>Captura de radical ABTS</b> ( $\mu\text{mol TE/g}$ )	Especial cúbico	$Y = 60,43x_1 + 63,32x_2 + 63,10x_3 + 25,04x_1x_2 + 19,33x_1x_3 + 22,47x_2x_3 + 39,87x_1x_2x_3$	202,95	0,99	< 0,001
<b>FRAP</b> ( $\mu\text{mol TE/g}$ )	Especial cúbico	$Y = 27,6x_1 + 29,3x_2 + 29,9x_3 - 4,1x_1x_2 + 15,7x_1x_3 - 109,2x_1x_2x_3$	809,62	0,99	< 0,001
<b>ORAC</b> ( $\mu\text{mol TE/g}$ )	Quadrático	$Y = 555,9x_1 + 488,8x_2 + 501,8x_3 + 376,6x_1x_2 + 140,5x_1x_3 + 395,2x_2x_3$	35,03	0,92	< 0,001

Os valores codificados nas equações representam os componentes da mistura e suas interações:  $x_1$  = Flavourzyme® 500L;  $x_2$  = Alcalase® 2.4L e  $x_3$  = Neutrase® 0.8L

Os valores apresentados pela ANOVA nas Tabelas 14 e 15 mostraram que todos os modelos propostos forneceram bons ajustes aos dados, em que 99% da variação dos resultados são explicados ( $R^2 = 0,99$ ) e o modelo para resposta ORAC dos hidrolisados proteicos de feijão vermelho 92% da variação dos resultados são explicados ( $R^2 = 0,92$ ), os valores de F calculados são superiores aos de F-tabelado e valores de p-valor < 0,001.

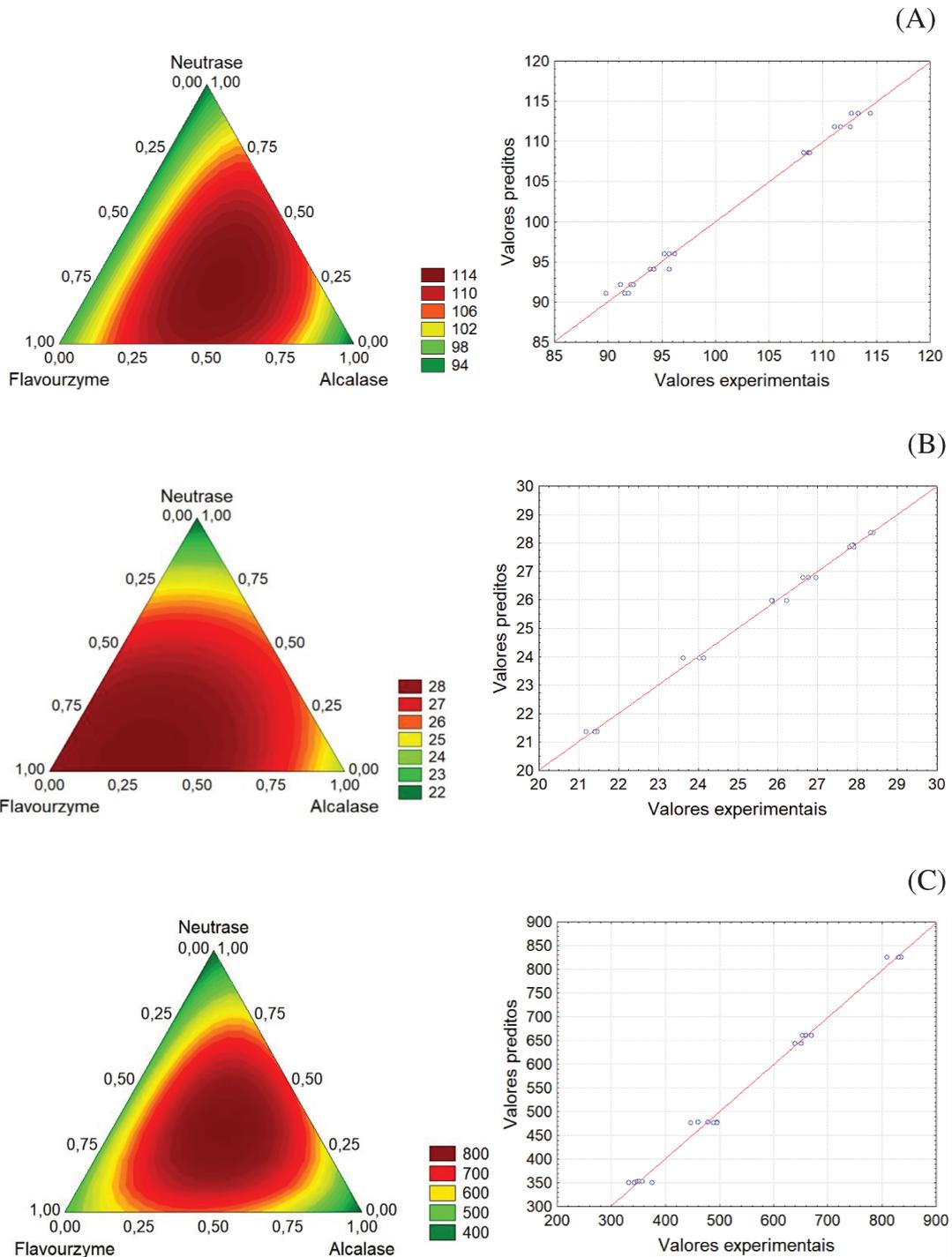
### 5.5 - Análise das curvas de contorno

As Figuras 7 e 8 respectivamente ilustram as proporções das enzimas Flavourzyme®, Alcalase® e Neutrase® que resultaram em maiores valores de atividade

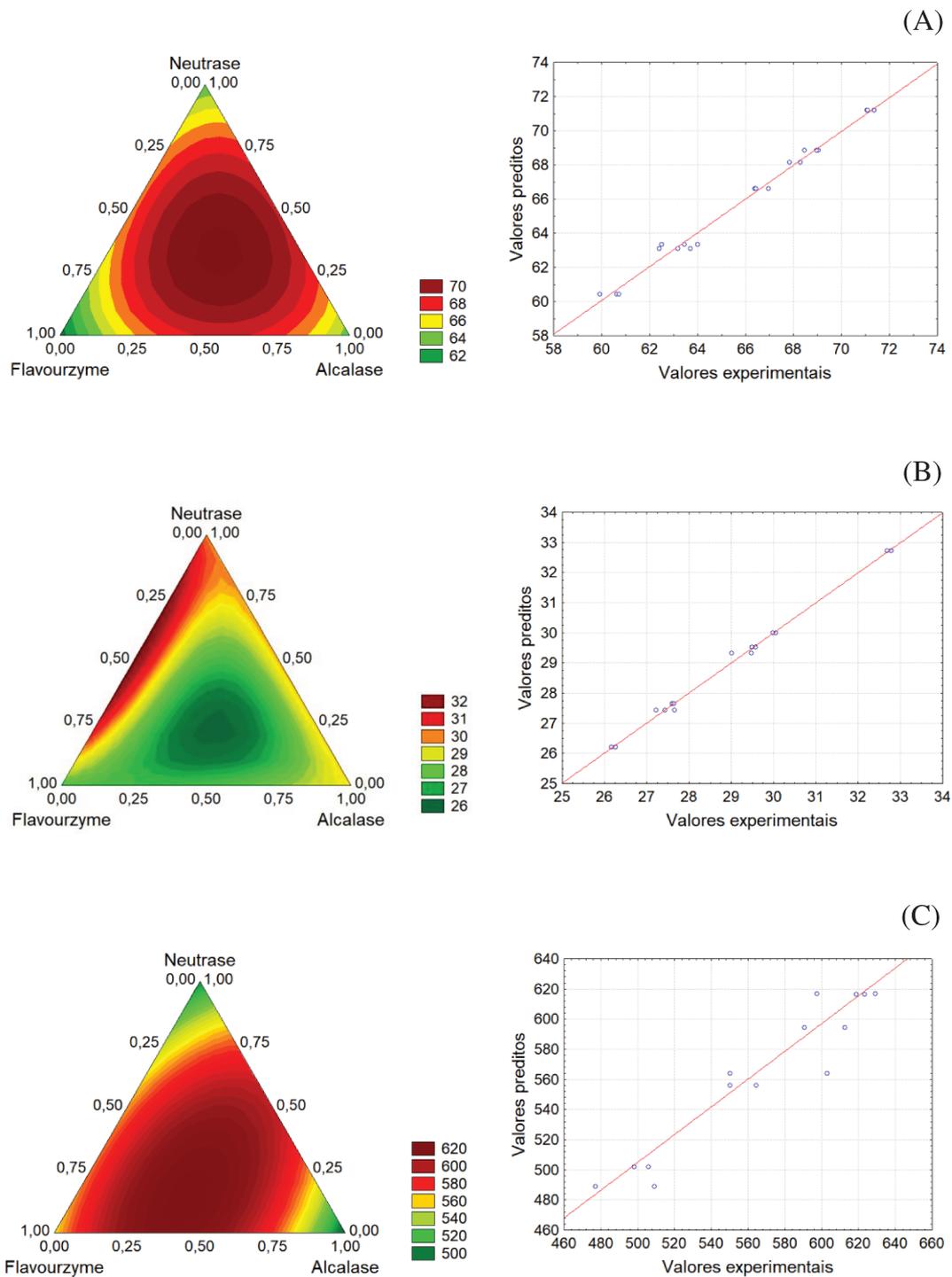
antioxidante para as amostras de hidrolisados proteicos de feijão carioca e vermelho utilizando curvas de contorno de misturas. Na curva de contorno cada vértice do triângulo equilátero correspondem às respostas obtidas usando as três enzimas individuais, os pontos médios dos três lados do triângulo representam os resultados das misturas binárias de enzima e no centro do triângulo (centroide) indica a variação dos resultados para as misturas ternárias (CASTRO et al., 2017).

Avaliando as curvas de contorno das Figuras 7A e 7C dos hidrolisados proteicos de feijão carioca, a combinação ternária de Flavourzyme®, Alcalase® e Neutrase® resultou em maior efeito sinérgico, alcançando resultados de atividade antioxidante superiores aos obtidos com as enzimas na forma pura e nas combinações binárias, como mostrado anteriormente na Tabela 7, no ensaio 7. A Figura 7B ilustra os resultados avaliados pelo método FRAP que resultou em um modelo quadrático (Tabela 15), em que a interação ternária não foi significativa mesmo com valores de atividade antioxidante altos. Isso ocorreu porque a amostra de proteína hidrolisada com mistura binária de Flavourzyme® e Alcalase® alcançou um resultado de atividade antioxidante ainda mais alto e por esse motivo foi dispensável a mistura ternária para a resposta FRAP. Porém como a amostra de proteína hidrolisada com mistura ternária (ensaio 7, Tabela 7) foi significativa e mostrou os valores mais altos de atividade antioxidante para as respostas ABTS e ORAC, a mesma foi selecionada como amostra hidrolisada com maior capacidade antioxidante.

As curvas de contorno da Figura 8A dos hidrolisados proteicos de feijão vermelho ilustram que a utilização de combinação ternária de Flavourzyme®, Alcalase® e Neutrase® resultou em maior efeito sinérgico, com resultados de atividade antioxidante mais altos. A Figura 8C mostra que o hidrolisado proteico preparado com a mistura ternária também mostrou resultado de atividade antioxidante alto, porém o hidrolisado proteico preparado com a mistura binária de Flavourzyme® e Alcalase® foi superior, resultando em um modelo quadrático (Tabela 16). O hidrolisado proteico obtido com a mistura binária de Flavourzyme® e Neutrase® apresentou o melhor resultado de atividade antioxidante para a resposta FRAP (Figura 8B).



**Figura 7** - Curvas de contorno e gráfico de valores experimentais versus valores preditos para atividades antioxidantes ( $\mu\text{mol TE/g}$ ) de hidrolisados proteicos de feijão carioca avaliada por: Captura de radical ABTS (A), ensaio FRAP (B) e ORAC (C).



**Figura 8** - Curvas de contorno e gráfico de valores experimentais versus valores preditos para atividades antioxidantes ( $\mu\text{mol TE/g}$ ) de hidrolisados proteicos de feijão vermelho avaliada por: Captura de radical ABTS (A), ensaio FRAP (B) e ORAC (C).

Considerando-se a maioria dos modelos gerados, a amostra de hidrolisado proteico de feijão vermelho preparado com mistura binária de Flavourzyme® e Alcalase® foi selecionada como a amostra com maior atividade antioxidante, pois apresentou o melhor resultado para a resposta ORAC e o segundo melhor resultado para a resposta ABTS.

Os gráficos de valores experimentais versus valores preditos apresentados nas Figuras 7 e 8 mostram que as respostas de atividade antioxidante obtidas experimentalmente estão alinhadas com as que foram preditas pelo modelo, confirmando o alto coeficiente de correlação ( $R^2$ ) que variou de 0,92 a 0,99 para os resultados de atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos de feijão carioca e vermelho.

Nas Tabelas 17 e 18 estão apresentados os valores de atividade antioxidante para as amostras selecionadas com maior atividade antioxidante, sendo o ensaio 7 para os hidrolisados proteicos de feijão carioca e ensaio 4 para os hidrolisados proteicos de feijão vermelho.

**Tabela 17** - Análise da atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos de feijão carioca obtidos com as enzimas Flavourzyme®, Alcalase® e Neutrase® (ensaio 7)\*

Análise	Amostra hidrolisada	Controle
<b>Captura de radical ABTS (<math>\mu\text{mol TE/g}</math>)</b>	113,91 $\pm$ 0,57 <sup>a</sup>	67,13 $\pm$ 0,54 <sup>b</sup>
<b>FRAP (<math>\mu\text{mol TE/g}</math>)</b>	27,90 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	10,41 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>
<b>ORAC (<math>\mu\text{mol TE/g}</math>)</b>	825,20 $\pm$ 14,04 <sup>a</sup>	117,30 $\pm$ 7,46 <sup>b</sup>

\*Resultados apresentados como média ( $n = 3$ )  $\pm$  desvio padrão. Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre os resultados pelo *Teste de Tukey*.

**Tabela 18** - Análise da atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos de feijão vermelho obtidos com as enzimas Flavourzyme® e Alcalase® (ensaio 4)\*.

Análise	Amostra hidrolisada	Controle
<b>Captura de radical ABTS (<math>\mu\text{mol TE/g}</math>)</b>	68,14 $\pm$ 0,26 <sup>a</sup>	44,64 $\pm$ 0,60 <sup>b</sup>
<b>FRAP (<math>\mu\text{mol TE/g}</math>)</b>	27,44 $\pm$ 0,22 <sup>a</sup>	15,42 $\pm$ 0,12 <sup>b</sup>
<b>ORAC (<math>\mu\text{mol TE/g}</math>)</b>	620,44 $\pm$ 2,69 <sup>a</sup>	167,46 $\pm$ 1,88 <sup>b</sup>

\*Resultados apresentados como média (n = 3)  $\pm$  desvio padrão. Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística (p < 0,05) entre os resultados pelo *Teste de Tukey*.

Os resultados de atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos de feijão carioca e feijão vermelho (Tabelas 17 e 18) avaliados pelo método ORAC (620,44 a 825,20  $\mu\text{mol TE/g}$ ) foram maiores que a atividade antioxidante do hidrolisado proteico de feijão preto, preparado com a enzima Alcalase®, a 50°C e pH 8,0 (557,34  $\mu\text{mol TE/g}$ ) descrito por Rocha et al. (2015) e menor que aquele do hidrolisado proteico de linhaça (930  $\mu\text{mol TE/g}$ ) obtido com Alcalase®, a 60°C e pH 8,5, enquanto que valores obtidos pelo ensaio FRAP (27,44 a 27,90  $\mu\text{mol TE/g}$ ) foi maior que a atividade antioxidante do hidrolisado proteico de linhaça (20  $\mu\text{mol TE/g}$ ) obtido por Silva et al., (2017) e maiores (68,14 a 113,91  $\mu\text{mol TE/g}$ ) que o obtido para o hidrolisado proteico de soja pelo ensaio de captura de radicais ABTS (28,50  $\mu\text{mol TE/g}$ ), utilizando pepsina a 37°C e pH 1,3 relatado por Vasconcellos (2014).

Betancur-Ancona et al (2014) estudaram a atividade antioxidante de proteína concentrada de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) variedade Jamapa negra, hidrolisada com as preparações enzimáticas de proteases Alcalase®, Flavourzyme®, pepsina, pancreatina e sistemas combinados contendo Alcalase®-Flavourzyme® e pepsina-pancreatina. Os autores observaram que a combinação das diferentes enzimas resultou em maiores graus de hidrólise, atingindo valores de aproximadamente 30% após 90 minutos de reação. As amostras de proteína concentrada de feijão Jamapa negra submetida a hidrólise sequencial com Alcalase®, em pH 8,0 e 50°C e Flavourzyme® em pH 7,0 e 50°C apresentou maior atividade antioxidante avaliada pelo método ABTS, atingindo 8,1 mM TE/mg de amostra após 90 minutos de reação. Já para a hidrólise sequencial pepsina-pancreatina em pH 2,0 a 37°C para pepsina e pH 7,5 a 37°C para pancreatina, as amostras atingiram 6,4 mM TE/mg de amostra após 90 minutos de reação.

As amostras 7 (Flavourzyme<sup>®</sup> + Alcalase<sup>®</sup> + Neutrase<sup>®</sup>) e 4 (Flavourzyme<sup>®</sup> + Alcalase<sup>®</sup>) de hidrolisados proteicos de feijão carioca e vermelho, respectivamente, foram selecionadas com maiores valores de atividade antioxidante e foram utilizadas para a avaliação dos compostos interferentes, tais como fenólicos totais, flavonóides, taninos condensados e antocianinas e análise das demais atividades biológicas: atividade inibitória da enzima conversora de angiotensina (ECA) (atividade anti-hipertensiva), atividade anti-inflamatória e capacidade de inibir a polifenoloxidase.

### 5.6 - Caracterização dos compostos interferentes

Durante o processo de extração da fração proteica, os compostos fenólicos que se apresentam ligados às proteínas, podem ser carreados e estar presentes no concentrado proteico. Na hidrólise enzimática das proteínas, esses compostos podem ser liberados, juntamente com os aminoácidos e peptídeos, podendo interferir na atividade antioxidante do hidrolisado, seja de maneira sinérgica ou não e por isso foram tratados como interferentes (SILVA, 2012).

A Tabela 19 ilustra que a amostra de proteína hidrolisada de feijão carioca (Flavourzyme<sup>®</sup> + Alcalase<sup>®</sup> + Neutrase<sup>®</sup>) apresentou maior capacidade redutora total, teor de flavonoides e taninos em comparação com a amostra controle, mostrando que possivelmente o tratamento enzimático tenha liberado esses compostos que estavam ligados às proteínas.

**Tabela 19** – Capacidade redutora total, flavonoides e taninos condensados nas amostras de proteína de feijão carioca hidrolisada e controle (sem tratamento enzimático).

Compostos interferentes	Amostra hidrolisada (Flavourzyme <sup>®</sup> + Alcalase <sup>®</sup> + Neutrase <sup>®</sup> )	Controle
<b>Capacidade redutora total (mg GAE/g)</b>	15,31 ± 0,16 <sup>a</sup>	5,25 ± 0,09 <sup>b</sup>
<b>Flavonoides (mg CE/g)</b>	1,58 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,92 ± 0,01 <sup>b</sup>
<b>Taninos (mg CE/g)</b>	1,56 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,59 ± 0,002 <sup>b</sup>

Os resultados são apresentados como a média (n = 3) ± DP e letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa com p < 0,05.

**Tabela 20** – Capacidade redutora total, flavonoides, taninos condensados e antocianinas nas amostras de proteína de feijão vermelho hidrolisada e controle (sem tratamento enzimático).

<b>Compostos interferentes</b>	<b>Amostra hidrolisada (Flavourzyme<sup>®</sup> + Alcalase<sup>®</sup>)</b>	<b>Controle</b>
<b>Capacidade redutora total (mg GAE/g)</b>	17,68 ± 0,08 <sup>a</sup>	4,18 ± 0,08 <sup>b</sup>
<b>Flavonoides (mg CE/g)</b>	1,73 ± 0,005 <sup>a</sup>	0,98 ± 0,04 <sup>b</sup>
<b>Taninos (mg CE/g)</b>	2,30 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,52 ± 0,04 <sup>b</sup>
<b>Antocianinas (mg EGC/g)</b>	0,06 ± 0,002 <sup>b</sup>	0,12 ± 0,003 <sup>a</sup>

Os resultados são apresentados como a média (n = 3) ± DP e letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa com p<0,05.

A amostra de proteína hidrolisada de feijão vermelho (Flavourzyme<sup>®</sup> + Alcalase<sup>®</sup>) (Tabela 20) apresentou maior capacidade redutora total, teor de flavonóides e taninos em comparação com a amostra controle. No entanto o conteúdo de antocianinas monoméricas diminuiu de 0,12 mg CGE/g na amostra controle para 0,06 mg CGE/g na amostra hidrolisada, mostrando que nesse caso pode ter ocorrido decomposição das antocianinas com o tratamento enzimático.

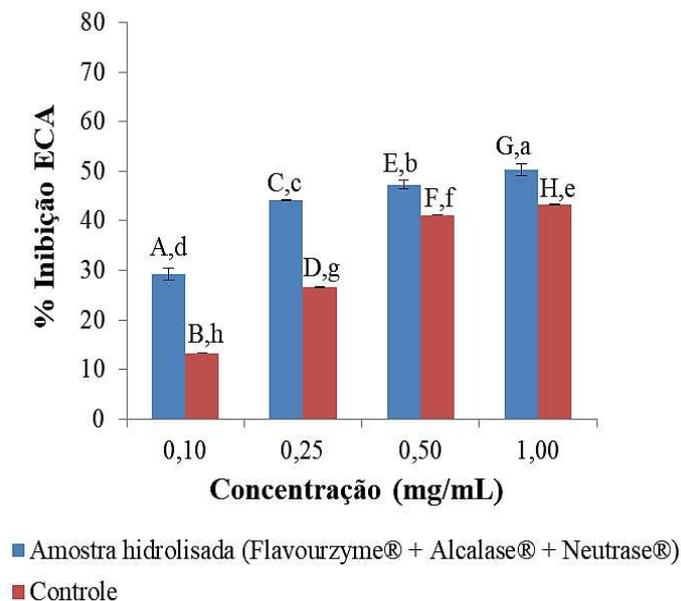
Xu e Chang (2007) estudaram extratos de diferentes vegetais e encontraram maiores valores de taninos condensados no feijão preto (6,74 mg CE/g) e lentilha (8,78 mg CE/g) quando comparados aos obtidos nas amostras de feijão carioca e vermelho tanto na amostra hidrolisada, quanto na amostra controle. O teor de flavonoides totais foram maiores em feijão preto (3,21 mg CE/g), lentilha (2,21 mg CE/g), e grão de bico (3,16 mg CE/g) e o teor de compostos fenólicos totais foram menores no feijão preto (6,89 mg GAE/g), lentilha (7,53 mg GAE/g) e grão de bico (1,81 mg GAE/g) quando comparados aos obtidos nas amostras hidrolisadas de proteína de feijão carioca (15,31 mg GAE/g) e vermelho (17,68 GAE/g).

Sancho et al (2015) obtiveram maior valor de antocianinas em feijão preto (0,83 mg CGE/g) e menor valor em feijão vermelho (0,08 mg CGE/g) quando comparados aos valores encontrados para a amostra controle de proteína de feijão vermelho (0,12 mg CGE/g).

### 5.7 - Avaliação da atividade inibitória da enzima conversora de angiotensina (ECA)

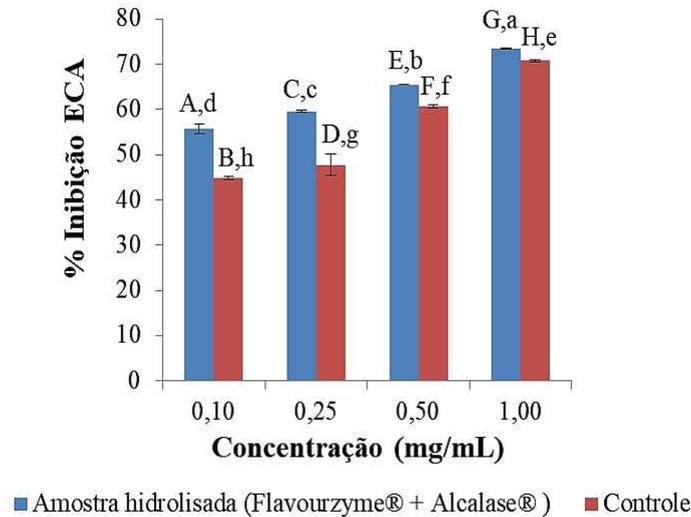
A amostra de proteína hidrolisada de feijão carioca (Flavourzyme® + Alcalase® + Neutrase®) nas concentrações de 0,1 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL e 1 mg/mL, inibiu 29,33%, 44,25%, 47,33% e 50,39% a enzima conversora de angiotensina (ECA) enquanto que a amostra controle nas mesmas concentrações inibiu 13,33%, 26,61%, 41,19% e 43,19% respectivamente (Figura 9). Foi observado um melhor efeito nas concentrações de 0,1 mg/mL e 0,25 mg/mL, atingindo diferenças de 16% e 17,64% na inibição da ECA entre a amostra hidrolisada e amostra controle.

A amostra de proteína hidrolisada de feijão vermelho (Flavourzyme® + Alcalase®), nas concentrações de 0,1 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL e 1 mg/mL inibiu 55,74%, 59,61%, 65,46% e 73,49% a enzima conversora de angiotensina e enquanto que a amostra controle inibiu 4,85%, 47,78%, 60,71% e 70,75%, respectivamente (Figura 10). Foram obtidas diferenças de 10,89% e 11,83% na inibição da ECA entre a amostra hidrolisada e amostra controle nas concentrações de 0,1 mg/mL e 0,25 mg/mL respectivamente.



**Figura 9** – Efeito da concentração da amostra de proteína hidrolisada de feijão carioca e do controle na inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA).

\*Letras maiúsculas mostram diferença significativa entre as mesmas concentrações entre a amostra hidrolisada e controle.\*\*Letras minúsculas mostram diferença significativa entre as concentrações em cada amostra (hidrolisada e controle).



**Figura 10** – Efeito da concentração da amostra hidrolisada de proteína de feijão vermelho e do controle na inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA).

\*Letras maiúsculas mostram diferença significativa entre as mesmas concentrações entre a amostra hidrolisada e controle.\*\*Letras minúsculas mostram diferença significativa entre as concentrações em cada amostra (hidrolisada e controle).

Wan Mohtar et al. (2014) estudaram a obtenção de hidrolisados de proteína de feijão alado (*Psophocarpus tetragonolobus* (L) DC), comum na Malásia, com atividade de inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA), utilizando as enzimas Alcalase®, Flavourzyme®, papaína e bromelina em um tempo total de 5 horas de reação. Os hidrolisados proteicos com papaína mostraram os melhores resultados, alcançando 50% de inibição da atividade da ECA com concentração de 0,065 mg/mL, enquanto que os hidrolisados com Flavourzyme® e Alcalase® apresentaram 50% de inibição da atividade da ECA nas concentrações de 0,161 mg/mL e 0,091 mg/mL, respectivamente. Garcia-Mora et al. (2015) também estudaram a atividade de inibição da enzima conversora de angiotensina utilizando hidrolisados proteicos de uma variedade de feijão comum com Alcalase® e Savinase e foi obtido um valor de IC50 (concentração que inibe 50% da atividade de ECA) de 0,26 mg/mL com 120 minutos de hidrólise com Alcalase e 0,23 mg/mL com 90 minutos de hidrólise com Savinase.

Wang et al. (2016) estudaram a inibição da enzima conversora de angiotensina utilizando hidrolisados proteicos de nozes preparados com pepsina. Os peptídeos com tamanhos menores do que 5 KDa apresentaram inibição de 50% da atividade de ECA em uma concentração de aproximadamente 0,40 mg/mL. Hidrolisados de proteína de colza com Alcalase<sup>®</sup> também foram estudados quanto à atividade de inibição da enzima conversora de angiotensina sendo obtido IC50 de 0,156 mg/mL (MAKINEN et al., 2016).

Rui et al., (2013) demonstraram que a hidrólise sequencial de proteínas isoladas do feijão utilizando Alcalase<sup>®</sup>, papaína e enzimas gastrointestinais resultaram em hidrolisados proteicos com maior capacidade de inibição da atividade da ECA, obtendo um valor de IC50 de 67,2 µg/mL.

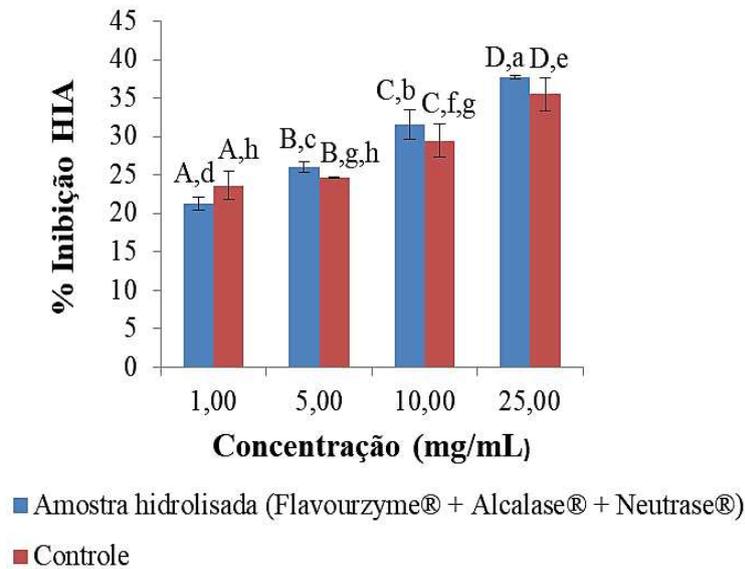
A amostra de proteína hidrolisada de feijão carioca (Flavourzyme<sup>®</sup> + Alcalase<sup>®</sup> + Neutrase<sup>®</sup>) e amostra controle, na concentração de 1 mg/mL, inibiram a ECA 50,39% e 43,19% respectivamente. A amostra de proteína hidrolisada de feijão vermelho (Flavourzyme<sup>®</sup> + Alcalase<sup>®</sup>) e amostra controle, na concentração de 1 mg/mL, inibiram a ECA 73,49 % e 70,75% respectivamente, indicando que as amostras de proteína controle sem tratamento com proteases também apresentaram capacidade de inibição da ECA.

Nos trabalhos citados não foram mencionados os resultados de inibição da atividade da ECA pelas amostras controle dos hidrolisados proteicos.

## **5.8 - Avaliação da inibição da enzima hialuronidase (HIA)**

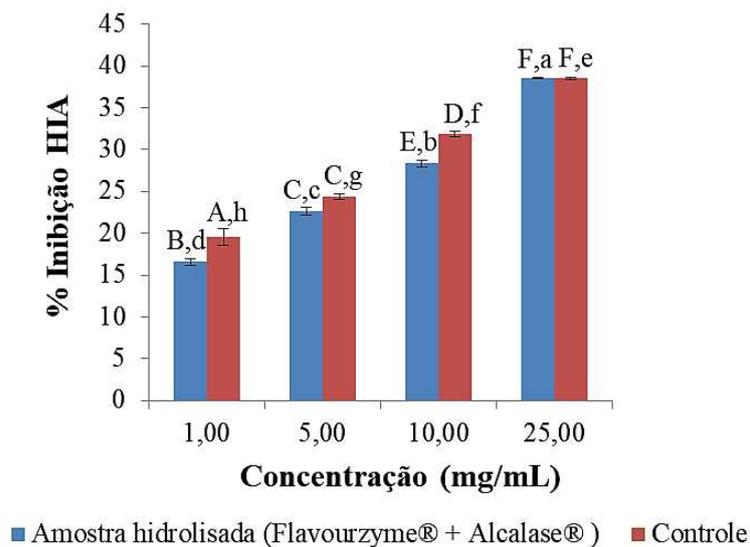
A amostra de proteína hidrolisada de feijão carioca (Flavourzyme<sup>®</sup> + Alcalase<sup>®</sup> + Neutrase<sup>®</sup>) nas concentrações de 1, 5, 10 e 25 mg/mL inibiram 21,24%, 26,05%, 31,63% e 37,70% a hialuronidase enquanto que as amostras controle inibiram 23,62%, 24,65%, 29,46% e 35,50% a enzima (Figura 11).

A amostra de proteína hidrolisada de feijão vermelho (Flavourzyme<sup>®</sup> + Alcalase<sup>®</sup>) nas concentrações de 1, 5, 10 e 25 mg/mL inibiram a hialuronidase 16,56%, 22,61%, 28,38% e 38,55%, enquanto que as amostras controle inibiram 19,56%, 24,36%, 31,85% e 38,50% a enzima (Figura 12). Os resultados indicam que a hidrólise de proteínas de feijão não resultou na formação de peptídeos com atividade de inibição da hialuronidase quando comparados com a respectiva amostra controle.



**Figura 11** – Efeito da concentração da amostra de proteína hidrolisada de feijão carioca e do controle na inibição da enzima hialuronidase (HIA).

\*Letras maiúsculas mostram diferença significativa entre as mesmas concentrações entre a amostra hidrolisada e controle. \*\*Letras minúsculas mostram diferença significativa entre as concentrações em cada amostra (hidrolisada e controle).



**Figura 12** – Efeito da concentração da amostra de proteína hidrolisada de feijão vermelho e do controle na inibição da enzima hialuronidase (HIA).

\*Letras maiúsculas mostram diferença significativa entre as mesmas concentrações entre a amostra hidrolisada e controle. \*\*Letras minúsculas mostram diferença significativa entre as concentrações em cada amostra (hidrolisada e controle).

A atividade anti-inflamatória de peptídeos das frações proteicas glicinina e  $\beta$ -conglucina da soja foram estudadas por Vasconcellos (2014) pelo método de inibição da enzima hialuronidase. Os peptídeos foram produzidos por meio da hidrólise enzimática com pepsina em pH 1,3 a 37°C durante duas horas. Neste estudo foram obtidas inibições da hialuronidase de 70% e 86,3% para as frações de  $\beta$ -conglucina e glicinina, respectivamente, na concentração de 1000  $\mu\text{g/mL}$ . Nesse estudo o autor não comparou a inibição da enzima hialuronidase utilizando a amostra controle.

Nakchuma e Kim (2015) descreveram a obtenção de hidrolisados de colágeno de pele de lula com Alcalase<sup>®</sup>, em pH 7,0 a 60°C por 80 minutos. Os autores verificaram que a fração de 3 – 10 KDa, na concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$ , inibiu 32,21% a atividade de hialuronidase. Os aminoácidos encontrados em maior quantidade nessa fração foram glicina, valina, prolina, serina, ácido aspártico e alanina. Os autores não descreveram o efeito da amostra controle na inibição da enzima hialuronidase.

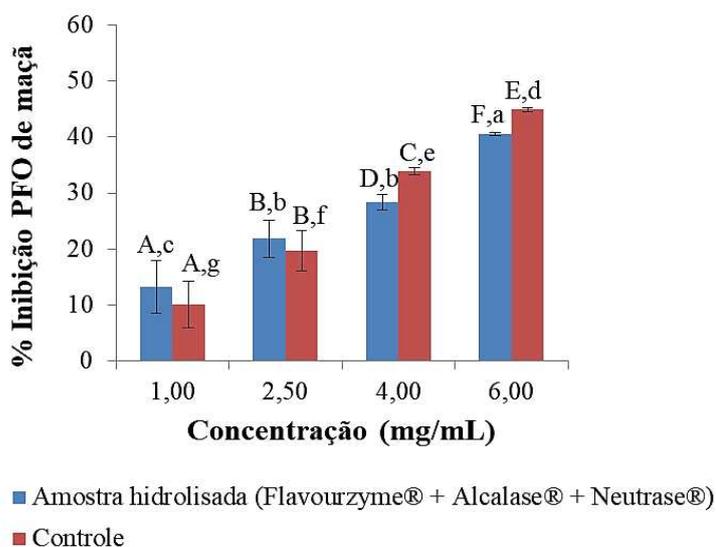
Liyanaarachchi et al (2018) estudaram a inibição da hialuronidase por extratos de plantas medicinais do Sri Lanka e observaram uma redução de 95% na atividade da hialuronidase na presença de extrato de *Curcuma aromatica* na concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$ .

## 5.9 - Avaliação da inibição da enzima polifenoloxidase (PFO)

A amostra de proteína hidrolisada de proteína de feijão carioca (Flavourzyme<sup>®</sup> + Alcalase<sup>®</sup> + Neutrase<sup>®</sup>) nas concentrações de 1 mg/mL, 2,5 mg/mL, 4 mg/mL e 6 mg/mL inibiu 13,30%, 21,90%, 28,40% e 40,50% a polifenoloxidase (PFO) de maçã enquanto que a amostra controle inibiu 10,10%, 19,70%, 33,90% e 44,90% nas mesmas concentrações respectivamente, indicando que a proteína hidrolisada de feijão carioca não aumentou significativamente a inibição da PFO de maçã comparada com a amostra controle (Figura 13).

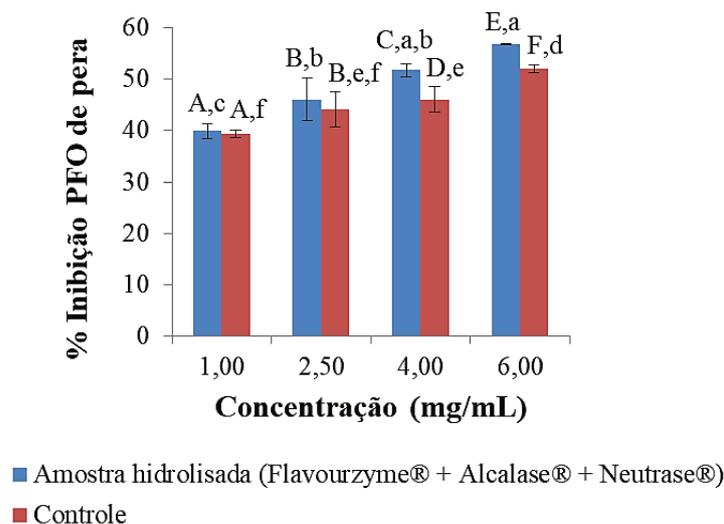
A amostra de proteína hidrolisada de feijão carioca (Flavourzyme<sup>®</sup> + Alcalase<sup>®</sup> + Neutrase<sup>®</sup>) nas concentrações de 1 mg/mL, 2,5 mg/mL, 4 mg/mL e 6 mg/mL inibiu 39,90%, 46,10%, 51,80% e 56,90% a PFO de pera, enquanto que para essas mesmas concentrações os valores obtidos de inibição na presença da amostra controle foram de

39,30%, 44,10%, 46,10% e 52,10% respectivamente, não apresentando aumento significativo entre amostra hidrolisada e amostra controle na inibição da PFO de pera nas concentrações de 1 mg/mL e 2,5 mg/mL. Nas concentrações de 4 mg/mL e 6 mg/mL, aumentou cerca de 5,7% e 4,8% a inibição da PFO de pera em relação aos respectivos controles (Figura 14).



**Figura 13** – Efeito da concentração da amostra de proteína hidrolisada de feijão carioca e da amostra controle na inibição do extrato enzimático de polifenoloxidase (PFO) de maçã.

\*Letras maiúsculas mostram diferença significativa entre as mesmas concentrações entre a amostra hidrolisada e controle. \*\*Letras minúsculas mostram diferença significativa entre as concentrações em cada amostra (hidrolisada e controle)

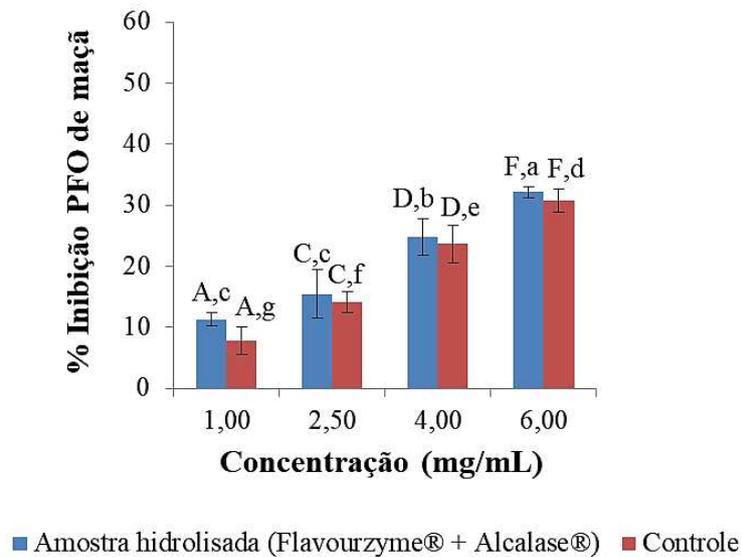


**Figura 14** - Efeito da concentração da amostra de proteína hidrolisada de feijão carioca e da amostra controle na inibição do extrato enzimático de polifenoloxidase (PFO) de pera.

\*Letras maiúsculas mostram diferença significativa entre as mesmas concentrações entre a amostra hidrolisada e controle. \*\*Letras minúsculas mostram diferença significativa entre as concentrações em cada amostra (hidrolisada e controle).

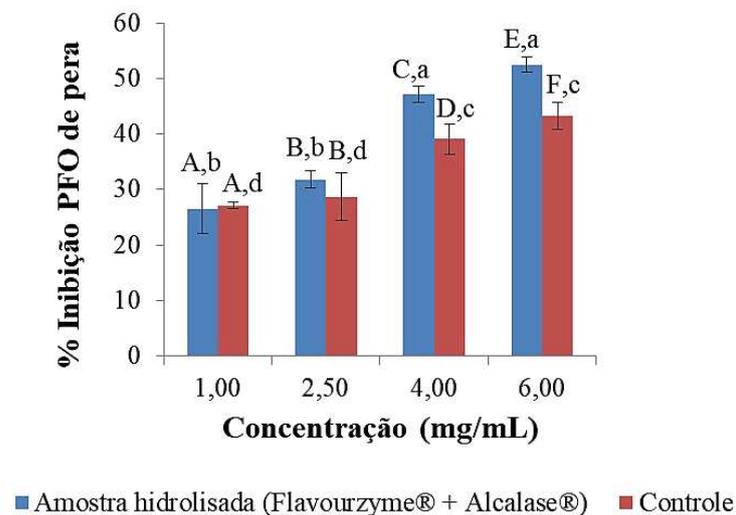
A amostra de proteína hidrolisada de feijão vermelho (Flavourzyme® + Alcalase®) inibiu 11,30%, 15,40%, 24,80% e 32,10% a PFO de maçã enquanto que a amostra controle inibiu 7,80%, 14,10%, 23,60% e 30,70%, respectivamente, indicando que a proteína hidrolisada de feijão vermelho não aumentou significativamente a inibição da PFO de maçã comparada com a amostra controle (Figura 15).

A amostra de proteína hidrolisada de feijão vermelho (Flavourzyme® + Alcalase®) nas concentrações de 1 mg/mL e 2,5 mg/mL, inibiu 26,52% e 31,81% a PFO de pera enquanto que a amostra controle inibiu 27,10% e 28,68%, respectivamente não apresentando diferença significativa entre a amostra hidrolisada e amostra controle. Nas concentrações de 4 mg/mL e 6 mg/mL de proteína hidrolisada de feijão vermelho foi observado aumento de cerca de 7,99% e 9,22% de inibição da PFO de pera em relação aos respectivos controles, com valores de inibição de PFO de pera de 47,10% e 52,47% na presença da amostra hidrolisada e 39,11% e 43,25% na presença da amostra controle (Figura 16).



**Figura 15** - Efeito da concentração da amostra de proteína hidrolisada de feijão vermelho e da amostra controle na inibição do extrato enzimático de polifenoloxidase (PFO) de maçã.

\*Letras maiúsculas mostram diferença significativa entre as mesmas concentrações entre a amostra hidrolisada e controle. \*\*Letras minúsculas mostram diferença significativa entre as concentrações em cada amostra (hidrolisada e controle).



**Figura 16** - Efeito da concentração da amostra de proteína hidrolisada de feijão vermelho e da amostra controle na inibição do extrato enzimático de polifenoloxidase (PFO) de pera.

\*Letras maiúsculas mostram diferença significativa entre as mesmas concentrações entre a amostra hidrolisada e controle. \*\*Letras minúsculas mostram diferença significativa entre as concentrações em cada amostra (hidrolisada e controle).

Órtiz-Estrada et al (2012) verificaram que a fração de proteína globulinas do farelo de trigo na concentração 0,11 mg/mL inibiu cerca de 24% a atividade da polifenoloxidase de cogumelos (350U).

Kubglomsong e Theerakulkait (2014) estudaram o efeito do extrato de proteína de farelo de arroz na concentração de 0,08% (m/v) na inibição da polifenoloxidase de extratos enzimáticos de batata, maçã e banana na concentração de 1g/mL e observaram porcentagens de inibição de 15,94%, 9,09% e 5,85%, respectivamente.

A hidrólise enzimática da sericina, uma proteína da seda solúvel em água, foi estudada por Puangphet et al., (2015). A proteína foi submetida à hidrólise com Alcalase® em pH 8,8 e temperatura de 50°C durante três horas. A amostra de sericina hidrolisada na concentração de 5% (m/v) inibiu cerca de 95,5%, 79,49%, 69,99% e 68,30% para extratos brutos (0,5 g/mL) de PFO de maçã, berinjela, brotos de feijão e flor de banana, respectivamente. Nesse estudo não foi apresentado os resultados de inibição da amostra controle (não hidrolisada).

Silva (2017) relatou a obtenção de hidrolisado de proteínas do soro de leite bubalino com Alcalase®, em pH 8,0 a 50°C durante 4 horas. O hidrolisado proteico inibiu cerca de 50% a PFO do extrato enzimático de maçã (0,5 g/mL). O autor não comparou os resultados com a amostra controle.

## 6 – CONCLUSÃO

Os hidrolisados da proteína concentrada do feijão carioca e vermelho obtidos por meio de planejamento experimental de misturas, utilizando as enzimas Flavourzyme<sup>®</sup>, Alcalase<sup>®</sup> e Neutrase<sup>®</sup> apresentaram atividades antioxidantes superiores às amostras controle (não hidrolisadas) para as três metodologias de determinação utilizadas (ABTS, FRAP e ORAC).

As amostras 7 (Flavourzyme<sup>®</sup> + Alcalase<sup>®</sup> + Neutrase<sup>®</sup>) e 4 (Flavourzyme<sup>®</sup> + Alcalase<sup>®</sup>) de proteína hidrolisada de feijão carioca e vermelho, respectivamente, apresentaram uma correlação entre valores de proteína solúvel em TCA e atividade antioxidante, em que foram obtidos maiores valores de proteína solúvel em TCA de 64,28% e 70,81%, respectivamente, e também maiores valores de atividade antioxidante: 113,91  $\mu\text{mol TE/g}$  para o método ABTS, 27,90  $\mu\text{mol TE/g}$  para FRAP e 825,2  $\mu\text{mol TE/g}$  para ORAC para o hidrolisado proteico de feijão carioca (7) e 68,14  $\mu\text{mol TE/g}$  para ABTS, 27,44  $\mu\text{mol TE/g}$  para FRAP e 620,44  $\mu\text{mol TE/g}$  para ORAC para o hidrolisado proteico de feijão vermelho (4) e por tanto, as amostras 7 e 4 foram selecionadas para o estudo das demais bioatividades.

As amostras hidrolisadas de proteína de feijão carioca (Flavourzyme<sup>®</sup> + Alcalase<sup>®</sup> + Neutrase<sup>®</sup>) e vermelho (Flavourzyme<sup>®</sup> + Alcalase<sup>®</sup>), respectivamente, apresentaram aumento na capacidade redutora total, flavonoides e taninos condensados quando comparadas aos respectivos controles, possivelmente devido a liberação desses compostos após a hidrólise. Já o teor de antocianinas diminuiu na amostra hidrolisada de proteína de feijão vermelho, em relação ao controle.

As amostras de proteína hidrolisada de feijão carioca (Flavourzyme<sup>®</sup> + Alcalase<sup>®</sup> + Neutrase<sup>®</sup>) e vermelho (Flavourzyme<sup>®</sup> + Alcalase<sup>®</sup>), na concentração de 0,25 mg/mL aumentaram 17,64 % e 11,83% a inibição da atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) comparada com os respectivos controles.

Nos testes de inibição da enzima hialuronidase (HIA) as amostras controles e amostras hidrolisadas da proteína de feijão carioca e vermelho nas concentrações de 1 a 25 mg/mL apresentaram valores de inibição similares, não sendo observado um aumento na inibição da atividade de HIA com a aplicação das amostras hidrolisadas.

O mesmo ocorreu para os testes de inibição da enzima polifenoloxidase (PFO) de maçã, em que nas concentrações de 1 a 6 mg/mL das amostras hidrolisadas de proteína de feijão carioca e vermelho não foi obtido aumento na inibição da PFO de maçã em relação as amostras controles.

Na inibição da PFO de pera, a proteína hidrolisada de feijão carioca, nas concentrações de 4 mg/mL e 6 mg/mL, aumentou cerca de 5,7% e 4,8% a inibição da PFO de pera em relação aos respectivos controles, enquanto que a proteína hidrolisada de feijão vermelho nas concentrações de 4 mg/mL e 6 mg/mL aumentou cerca de 7,99% e 9,22% a inibição da PFO de pera em relação aos respectivos controles.

Os hidrolisados obtidos de proteína de feijão carioca e vermelho apresentaram resultados promissores na aplicação como antioxidantes, com valores superiores aos controles (proteína não hidrolisada), demonstrando um efeito positivo da hidrólise enzimática.

Assim como ocorreu com a atividade antioxidante, era esperado que os hidrolisados proteicos de feijão carioca e vermelho apresentassem resultados muito superiores aos controles (proteína não hidrolisada) na inibição da ECA, inibição da HIA e inibição da PFO, porém esta relação não foi observada com as metodologias de análises realizadas, em que os hidrolisados e os respectivos controles apresentaram resultados similares com poucas diferenças significativas.

## PERPECTIVAS FUTURAS

- Avaliar processos para que os compostos interferentes (fenólicos, flavonoides e taninos) sejam eliminados sem afetar a proteína hidrolisada;
- Avaliar o efeito da digestão *in vitro* nas amostras hidrolisadas;
- Purificar as amostras hidrolisadas e identificar a sequência de aminoácidos presentes nos peptídeos envolvidos nas bioatividades;
- Avaliar o efeito da purificação nas bioatividades;
- Estudar atividade antimicrobiana e antifúngica;
- Verificar a possibilidade de aplicação dos hidrolisados como antioxidantes conservadores.

## 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR, J.G.S., SATO, H.H. Microbial proteases: Production and application in obtaining protein hydrolysates. **Food Research International**, v. 103, p. 253-262, 2018.

AHN, C-B., CHO, Y-S, JE, J-Y. Purification and anti-inflammatory action of tripeptide from salmon pectoral fin byproduct protein hydrolysate. **Food Chemistry**, v. 168. p. 151–156, 2015.

AHN, C-B., JE, J-Y., CHO, Y-S. Antioxidant and anti-inflammatory peptide fraction from salmon byproduct protein hydrolysates by peptic hydrolysis. **Food Research International**, v. 49, p. 92-98, 2012.

ANGELO, P. M., JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.

ALEMÁN, A., PÉREZ-SANTÍN, E., BORDENAVE-JUCHEREAU, S., ARNAUDIN, I., GÓMEZ GUILLÉN, M.C., MONTERO, P. Squid gelatin hydrolysates with antihypertensive, anticancer and antioxidant activity. **Food Research International**, v. 44, p. 1044–1051, 2011.

BAH, C. S. F., BEKHIT, A.E.A., MCCONNELL, M. A., CARNE, A. Generation of bioactive peptide hydrolysates from cattle plasma using plant and fungal proteases. **Food Chemistry**, v. 213, p. 98 – 107, 2016

BALA, E., HAZARIKA, R., SINGH, P., YASIR, M., SHRIVASTAVA, R. A biological overview of hyaluronidase: A venom enzyme and its inhibition with plants materials. **Materials Today: Proceedings**, v. 5, p. 6406-6412, 2018.

BARBOSA, K. B. F., COSTA, N. M. B., Rita de Cássia Gonçalves ALFENAS, R.C.G., DE PAULA, S. O., MINIM, V. P. R., BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, Campinas, SP, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BASHO, S. M.; BIN, M. C. Propriedades dos alimentos funcionais e seu papel na prevenção e controle da hipertensão e diabetes. **Interbio**, v. 4, n°1, p. 48 – 58, 2010.

BELLUZZO, A. S. F. **Caracterização parcial da polifenoloxidase e avaliação de compostos fenólicos e antioxidantes em pêssego (cv. Biuti)**, 2008. 85p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

BETANCUR-ANCONA, D., SOSA-ESPINOZA, T., RUIZ-RUIZ, J., SEGURA-CAMPOS, M., CHEL-GUERRERO, L. Enzymatic hydrolysis of hard-to-cook bean (*Phaseolus vulgaris L.*) protein concentrates and its effects on biological and functional properties. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 49, p. 2-8, 2014.

BIZIULEVICIUS, G. A., KISLUKHINA, O. V., KAZLAUSKAITE, J., ZUKAITE, V. Food-protein enzymatic hydrolysates possess both antimicrobial and immunostimulatory activities: a ‘cause and effect’ theory of bifunctionality. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 46, p. 131-138, 2006.

CAMPOS, J. F. **Composição química e atividades biológicas da própolis das abelhas sem ferrão *Melipona orbignyi* e *Tetragonisca fiebrigi* (Hymenoptera, apidae)**, Tese de doutorado em Entomologia e Conservação da Biodiversidade, 2016. Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 2016.

CARRASCO-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.

CASTELO-BRANCO, V.N., TORRES, A.G. Capacidade antioxidante total de óleos vegetais comestíveis: determinantes químicos e sua relação com a qualidade dos óleos. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 24, n. 1, p. 173-187, 2011.

CASTRO, R. J. S. **Aplicação da ferramenta de planejamento experimental de misturas como estratégia para produção de proteases por *Aspergillus niger* e obtenção de hidrolisados proteicos com múltiplas propriedades funcionais e biológicas**, 2015. 297p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2015.

CASTRO, R. J. S.; CASON, V. G.; SATO, H. H. Binary mixture of proteases increases the antioxidant properties of white bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein-derived peptides obtained by enzymatic hydrolysis. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 10, p. 291 – 297, 2017.

CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Biologically active peptides: Processes for their generation, purification and identification and applications as natural additives in the food and pharmaceutical industries. **Food Research International**, v. 74, p. 185–198, 2015.

CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Comparison and synergistic effects of intact proteins and their hydrolysates on the functional properties and antioxidant activities in on simultaneous process of enzymatic hydrolysis. **Food and Bioproducts Processing**, v. 92, p.80-88, 2014.

CHARNEY, J., TOMARELLI, R.M., A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. **Journal of Biological Chemistry**, v.170, n. 23, p.501-505, 1947.

CHI, C-F., WANG, B., WANG, Y-M., ZHANG, B., DENG, S-G. Isolation and characterization of three antioxidant peptides from protein hydrolysate of bluefin leatherjacket (*Navodon septentrionalis*) heads. **Journal of Functional Foods**, v. 12, p. 1-10, 2015.

CÖMERT, E. D., GÖKMEN, V. Evolution of food antioxidants as a core topic of food science for a century. **Food Research International**, v. 105, p. 76-93, 2018.

DE LA FUENTE, M., LÓPEZ-PEDROUSO, M., ALONSO, J., SANTALLA, M., DE RON, A. M., ÁLVAREZ, G., ZAPATA, C. In-depth characterization of the phaseolin protein diversity of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) based on two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. **Food Technology and Biotechnology**, v. 50, n. 3, p. 315–325, 2012.

DIPLOCK, A. T., AGGETT, P. J., ASHWELL, M., BORNET, F., FERN, E.B., ROBERFROID, M. B. Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus document. **British Journal of Nutrition**, vol. 81, p. 51, 1999.

EVANGELHO, J.A., VANIER, N.L., PINTO, V.Z., DE BERRIOS, J.J., DIAS, A. R. G., ZAVAREZE, E.R. Black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein hydrolysates: Physicochemical and functional properties. **Food Chemistry**, v. 214, p. 460-467, 2017.

FALLER, A. L. K., FIALHO, E., LIU, R. H. Cellular antioxidant activity of Feijoadá whole meal coupled with an in vitro digestion. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 4826– 4832, 2012.

FAO. Disponível em: <http://faostat.fao.org/>. Acesso em 7 de fevereiro de 2017.

FAVERO, D. M., RIBEIRO, C. S. G., AQUINO, A. D. Sulfitos: importância na indústria alimentícia e seus possíveis malefícios à população. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 18, n°1, p. 11 – 20, 2011.

GARCIA-MORA, P., FRIAS, J. , PEÑAS, E., ZIELINSKI, H., GIMÉNEZ-BASTIDA, J.A., WICZKOWSKI, W., ZIELINSKA, D., MARTÍNEZ-VILLALUENGA, C. Simultaneous release of peptides and phenolics with antioxidant, ACE-inhibitory and anti-inflammatory activities from pinto bean (*Phaseolus vulgaris* L. var. pinto) proteins by subtilisins. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 319-332, 2015.

GRANATO, D., SHAHIDIB, F., WROLSTAD, R., KILMARTIND, P., MELTONE, L.D., HIDALGO, F.J., MIYASHITA, K., CAMPH, J.V., ALASALVARI, C., ISMAILJ, A.B., ELMOREK, S., BIRCHK, G.G., CHARALAMPOPOULOS, D., ASTLEY, S.B.,

PEGGM, R., ZHOUN, P., FINGLAS, P. Antioxidant activity, total phenolics and flavonoids contents: Should we ban in vitro screening methods? **Food Chemistry**, 2018, doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.012.

GÓMEZ-GUILLÉN, M. C., LÓPEZ-CABALLERO, M. E., LÓPEZ DE LACEY, A., ALEMÁN, A., GIMÉNEZ, B., MONTERO, P. Antioxidant and antimicrobial peptide fractions from squid and tuna skin gelatin. In Bihan, E. L., Koueta, N. Sea by-products as a real material: new ways of application. Kerala: Transworld Research Network Signpost, 2010. p. 89-115.

GU, M., CHEN, H-P., ZHAO, M-M., WANG, X., YANG, B., REN, J-Y., SU, G-W. Identification of antioxidant peptides released from defatted walnut (*Juglans sigillata Dode*) meal proteins with pancreatin. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60 p. 213-220, 2015.

GIUSTI, M., WROLSTAD, R. E. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, pp. F1.2.1–F1.2.13, 2001.

HAUSER-KAWAGUCHI, A., LUYT, L.G., TURLEY, E. Design of peptide mimetics to block pro-inflammatory functions of HA fragments. **Matrix Biology**, 2017, https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.01.021

HAYAT, I., AHMAD, A., MASUD, T., AHMED, A., BASHIR, S. Nutritional and health perspectives of beans (*Phaseolus vulgaris* L.): An overview. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 54, p. 580-592, 2014.

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B., CONTRERAS, M. M., RECIO, I. Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into foods. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 165, p. 23–35, 2011.

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B., GARCÍA-NEBOT, M. J., FERNÁNDEZ-TOMÉ, S., AMIGO, L., RECIO, I. Dairy protein hydrolysates: peptides for health benefits. **International Dairy Journal**, v. 38, p. 82-100, 2014.

HONG, F., MING, L., YI, S., ZHANXIA, L., YONGQUAN, W., CHI, L. The antihypertensive effect of peptides: A novel alternative to drugs? **Peptides**, v. 29, p. 1062-1071, 2008.

HUBER, K. **Evidências da interação entre proteínas e taninos de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*, L.) e seus efeitos na digestibilidade protéica**, 2012, 107 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

JULKUNEN-TITTO, R.; Phenolic constituents in the leaves of Northern Willows: Methods for the analysis of certain phenolics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 33, p. 213-217, 1985.

KAMARUDIN, F., GAN, C. Y. Molecular structure, chemical properties and biological activities of Pinto bean pod polysaccharide. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 88, p. 280 – 287, 2016.

KORHONEN, H. Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. **Journal of Functional Foods I**, p. 177-187, 2009.

KUBGLOMSONG, S., THEERAKULKAIT, C. Effect of rice bran protein extract on enzymatic browning inhibition in vegetable and fruit puree. **Natural Science**, v. 48, p. 205-213, 2014.

LEE, S. Y.; HUR, S. J. Antihypertensive peptides from animal products, marine organisms, and plants. **Food Chemistry**, v. 228, p. 506–517, 2017.

LENORMAND, H., TRANCHEPAIN, F., DESCHREVEL, B., Jean-Claude VINCENT, J. C. The hyaluronan–protein complexes at low ionic strength: How the hyaluronidase activity

is controlled by the bovine serum albumin. **Matrix Biology**, v. 28, n° 6, p. 365–372, 2009.

LEO, E.E.M., FERNÁNDEZ, J.J.A., CAMPOS, M.R.S. Biopeptides with antioxidant and anti-inflammatory potential in the prevention and treatment of diabetes disease. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 83, p. 816-826, 2016.

LIYANAARACHCHIA, G.D., SAMARASEKERA, J.K.R.R., MAHANAMAB, K.R.R., HEMALA, K.D.P. Tyrosinase, elastase, hyaluronidase, inhibitory and antioxidant activity of Sri Lankan medicinal plants for novel cosmeceuticals. **Industrial Crops & Products**, v. 111, p. 597-605, 2018.

LOS, F.G.B., ZIELINSKI, A.A.F., WOJEICCHOWSKI, J.P., NOGUEIRA, A., DEMIATE, I.M. Beans (*Phaseolus vulgaris* L.): whole seeds with complex chemical composition. **Current Opinion in Food Science**, v. 19, p. 63-71, 2018.

LOWRY, O. H., ROSENBROUGH, N. J., Fair, A. L., Randall, R. J. Protein measurement with the Folin-phenol reagents. **The Journal Biological Chemistry**, v. 193, p. 265–275, 1951

LUNA-VITAL, D. A., MOJICA, L., GONZÁLEZ DE MEJÍA, E., MENDOZA, S., LOARCAPIÑA, G., Biological potential of protein hydrolysates and peptides from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): a review. **Food Research International**, 2014, doi:10.1016/j.foodres.2014.11.024.

MÄKINEN, S., STRENG, T., LARSEN, L.B., LAINE, A., PIHLANT, A. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory and antihypertensive properties of potato and rapeseed protein-derived peptides. **Journal of Functional Foods**, v. 25, p. 160-173, 2016.

MALERICH, S., BERSON, D. Next Generation Cosmeceuticals. The latest in peptides, growth factors, cytokines and stem cells. **Dermatol Clinics**, v. 32, p. 13-21, 2014.

MARCHESAN, E.D., FERRONATTO, R., BEDNARSKI, F., ALENCAR, S.M., ONOFRE, S.B. Ação dos óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* D.C. e *Baccharis uncinella* D.C. (*Asteraceae*) sobre a atividade hialuronidase. **Arquivos de Ciências da Saúde da Unipar**, Umuarama, v. 10, n. 2, p. 63-66, 2006.

MATSUI, T., MATSUMOTO, K. Antihypertensive peptides from natural resources. In: KHAN, M. T. H., ATHER, A. Lead Molecules from Natural Products, **Elsevier**, p. 255-271, 2006.

MILLÁN-LINARES, M. D. C., YUST, M. D.M., ALCAIDE-HIDALGO, J. M.; MILLÁN, F.; PEDROCHE, J. Lupine protein hydrolysates inhibit enzymes involved in the inflammatory pathway. **Food Chemistry**, v. 151, p. 141 – 147, 2014.

MIRANDA, M. T. M., LIRIA, C. W. Técnicas de análise e caracterização de peptídeos e proteínas. In: PESSOA JR., A. e KILIKIAN, B. V. Purificação de Produtos Biotecnológicos. Barueri: Manole, 2008, cap. 21, p. 411 – 427.

MOJICA, L.; MEJÍA, E.G. Characterization and comparison of protein and peptide profiles and their biological activities of improved common bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.) from Mexico and Brazil. **Plant Foods for Human Nutrition**. V. 70, p. 105-112, 2015.

MOJICA, L., MEYER, A., BERHOWB, M.A., MEJÍA, E.G. Bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.) have similar high antioxidant capacity, *in vitro* inhibition of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase while diverse phenolic composition and concentration. **Food Research International Journal**, v. 69, p. 38-48, 2015.

MONTOYA, C.A; LALLÈS, J.P; BEEBE, S.; LATERME, P. Phaseolin diversity as a possible strategy to improve the nutritional value of common beans (*Phaseolus vulgaris*). **Food Research International**, v. 43, p. 443-449, 2010.

MORONTA, J., SMALDINI, P.L., DOCENA, G.H., AÑÓN, M.C. Peptides of amaranth were targeted as containing sequences with potential anti-inflammatory properties. **Journal of Functional Foods**, v. 21, p. 463-473, 2016.

MOTA, E.G. **Planejamento racional de agentes anti-hipertensivos multi-alvo**, 2015. 108p. Tese (Doutorado em Agroquímica). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.

NAKCHUM, L., KIM, S.M. (2015): Preparation of squid skin collagen hydrolysate as an antihyaluronidase, antityrosinase, and antioxidant agent. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, 2015, DOI: 10.1080/10826068.2014.995808.

NGO, D-H., KANG, K-H., RYU, B., VO, T-S., JUNG, W-K., BYUN, H-G., KIM, S-K. Angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides from antihypertensive skate (*Okamejei kenojei*) skin gelatin hydrolysate in spontaneously hypertensive rats. **Food Chemistry**, v. 174, p. 37–43, 2015.

NGO, D-H., VO, T-S., RYU, B., KIM, S-K. Angiotensin- I- converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from Pacific cod skin gelatin using ultrafiltration membranes. **Process Biochemistry**, v. 51, p. 1622-1628, 2016.

NOVOZYMES, **Proteases for biocatalysis**. Disponível em: [https://www.novozymes.com/-/media/Project/Novozymes/Website/website/document-library/Advance-your-business/Pharma/Biocatalysis\\_brochure\\_Proteases.pdf](https://www.novozymes.com/-/media/Project/Novozymes/Website/website/document-library/Advance-your-business/Pharma/Biocatalysis_brochure_Proteases.pdf). Acessado em: 26 de Setembro de 2017.

ORTÍZ-ESTRADA, A.M., MERCADO-RUIZ, J.N., GARCÍA-ROBLES, J.M., ISLAS-RUBIO, A.R., MENDOZA-WILSON, A.M., BALANDRÁN-QUINTANA, R.R. Wheat bran globulins: competitive inhibitors of mushroom tyrosinase. **Food Science and Biotechnology**, v.21, n. 3, p. 633-635, 2012.

OSEGUERA-TOLEDO, M. E., MEJIA, E. G., DIA, V. P., AMAYA-LLANO, S. L. Common bean (*Phaseolus vulgaris L.*) hydrolysates inhibit inflammation in LPS-induced

macrophages through suppression of NF- $\kappa$ B pathways. **Food Chemistry**, v. 127, p. 1175–1185, 2011.

PERONE, C. A. S., CAPOBIANCO, M. P., PAPARELI, S. J. Determinação de polifenóis (taninos) em produtos alimentícios (chás) usando biossensor polifenol oxidase, obtida de extrato bruto da casca de banana nanica (*Musa acuminata*) e caracterização desse biossensor. **Revista Instituto de Ciências da Saúde**, v. 27, n° 1, p. 28 – 34, 2009.

PIHLANTO, A. Antioxidative peptides derived from milk proteins. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 1306–1314, 2006.

PINTO, J.V. **Propriedades físicas, químicas, nutricionais e tecnológicas de feijões (*Phaseolus vulgaris* L.) de diferentes grupos de cor**, 2016, 167 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2016.

PUANGPHET, A., TIYABOONCHAI, W.; THONGSOOK, T. Inhibitory effect of sericin hydrolysate on polyphenol oxidase and browning of fresh-cut products. **International Food Research Journal**, v. 22, n°4, p. 1623 – 1630, 2015.

RIZZELLO, C. G.; TAGLIAZUCCHI, D.; BABINI, E., SEFORA, G.; TANEYO, D. L.; GIANOTTI, A. Bioactive peptides from vegetable food matrices: Research trends and novel biotechnologies for synthesis and recovery. **Journal of Functional Foods**, v. 27, p. 549–569, 2016.

ROCHA, T.S., HERNANDEZ, L.M.R., MOJICA, L., JOHNSON, M.H., CHANG, Y.K., MEJÍA, E.G. Germination of *Phaseolus vulgaris* and Alcalase hydrolysis of its proteins produced bioactive peptides capable of improving markers related to type-2 diabetes in vitro. **Food Research International**, v. 76, p. 150-159, 2015.

ROESLER, R., CATHARINO, R. R., MALTA, L. G., EBERLIN, M. N., PASTORE, G. Antioxidant activity of *Annona crassiflora*: Characterization of major components by electrospray ionization mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 104, p. 1048–1054, 2007.

RUI, X., BOYE, J. I., SIMPSON, B.K., PRASHER, S. O. Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides of small red bean (*Phaseolus vulgaris*) hydrolysates. **Journal of Functional Foods**, v. 3, p. 1116-1124, 2013.

RYDER, K., BEKHIT, A.E.D., MCCONNELL, M., CARNE, A. Towards generation of bioactive peptides from meat industry waste proteins: Generation of peptides using commercial microbial proteases. **Food Chemistry**, v. 208, p. 42–50, 2016.

SAADI, S. SAARI, N., ANWAR, F., HAMID, A.A., GHAZALI, H.M. Recent advances in food biopeptides: Production, biological functionalities and therapeutic applications. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 1, p. 80–116, 2015.

SAKANAKA, S.; TACHIBANA, Y.; ISHIHARA, N.; JUNEJA, L.R. Antioxidant activity of egg yolk protein hydrolysates in linoleic acid oxidation system. **Food Chemistry**, Oxford, v.86, n.1, p. 99-103, 2004.

SANCHO, R. A. S., PAVAN, V., PASTORE, G. M. Effect of in vitro digestion on bioactive compounds and antioxidant activity of common bean seed coats. **Food Research International**, v.76, p. 74–78, 2015.

SANTOS, I.R.C. **Escurecimento enzimático em frutos: Polifenoloxidase de atemóia (*Annona cherimola* Mill. X *Annona squamosa* L.)**, 2009. 119 p. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição). UNESP, Araraquara, 2009.

SANTOS, L. F., KOBLITZ, M. G. B. Proteases. In: KOBLITZ, M. G. B. *Bioquímica de Alimentos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 78-103.

SANTOS, V., ARAÚJO, W., TEIXEIRA, R., NASCIMENTO, J., BITTENCOURT, C., BOULLOSA, C. **Escurecimento enzimático em frutas**. Congresso Norte Nordeste de Pesquisa e Inovação, Palmas, Tocantins, 2012.

SANTOS, D.M.R.C., SOUZA, C.B., PEREIRA, H.J.V. Angiotensin converting enzymes in fish venom. **Toxicon**, v. 131, p. 63-67, 2017.

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

SENPHAN, T., BENJAKUL, S. Antioxidative activities of hydrolysates from seabass skin prepared using protease from hepatopancreas of Pacific white shrimp. **Journal of Functional Foods**, v. 6, p. 147-156, 2014.

SHARMA, K.M., KUMAR, R., PANWAR, S., KUMAR, A. Microbial alkaline proteases: Optimization of production parameters and their properties. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 15, p. 115–126, 2017.

SHEIH, I. C., FANG, T. J., WU, T. K.. Isolation and characterisation of a novel angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from the algae protein waste. **Food Chemistry**, v. 115, p. 279-284, 2009.

SILVA, A.G., ROCHA, L.C., CANNIATTI BRAZACA, S.G. Caracterização físico-química, digestibilidade protéica e atividade antioxidante de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.). **Revista Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v.20, n.4, p. 591-598, 2009.

SILVA, F.G.D. **Atividade antioxidante de produtos proteicos de linhaça (*Linum usitatissimum* L.)**, 2012, 78p. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

SILVA, F.G.D. **Capacidade antioxidante de hidrolisados proteicos e compostos fenólicos da linhaça (*Linum usitatissimum* L.) e moduladora da atividade inflamatória em modelo experimental de colite**, 2016, 165 p. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2016.

SILVA, F.G.D., HERNÁNDEZ-LEDESMA, B., AMIGO, L., NETTO, F.M., MIRALLES, B. Identification of peptides released from flaxseed (*Linum usitatissimum*) protein by Alcalase® hydrolysis: Antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v. 76, p. 140-146, 2017.

SILVA, F.G.D., MIRALLES, B., HERNÁNDEZ-LEDESMA, B., AMIGO, L., IGLESIAS, A.H., REYES, F.G.R., NETTO, F.M. Influence of protein–phenolic complex on the antioxidant capacity of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) Products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, p. 800-809, 2017.

SILVA, J. C.; RODRIGUES, S.; FEÁS, X.; ESTEVINHO, L. M. Antimicrobial activity, phenolic profile and role in the inflammation of propolis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 1790–1795, 2012.

SILVA, J. D. F. **Soro de leite bubalino hidrolisado com Alcalase como agente de controle de escurecimento de maçãs minimamente processadas**, 2017. 69p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) UFRGS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.

SILVA, M. V., ROSA, C. I. L. F., VILAS BOAS, E.V.B. Conceitos e métodos de controle do escurecimento enzimático no processamento mínimo de frutas e hortaliças. **B.CEPPA**, Curitiba v. 27, n° 1, p. 83-96, 2009.

SINGH, B., SINGH, J.P., KAURB, A., SINGH, N. Phenolic composition and antioxidant potential of grain legume seeds: A review. **Food Research International**, v. 101, p. 1-16, 2017.

SINGH, B. P., VIJ, S., HATI, S. Functional significance of bioactive peptides derived from soybean. **Peptides**, v. 54, p. 171–179, 2014.

SIOW, H-L., GAN, C-Y. Extraction of antioxidative and antihypertensive bioactive peptides from *Parkia speciosa* seeds. **Food Chemistry**, v. 141, p. 3435–3442, 2013.

SUETSUNA, K. Isolation and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitor dipeptides derived from *Allium sativum* L (garlic). **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 9, n°7, p. 415-419, 1998.

SUKHONTHARA, S.; KAEWKA, K.; THEERAKULKAIT, C. Inhibitory effect of rice bran extracts and its phenolic compounds on polyphenol oxidase activity and browning in potato and apple puree. **Food Chemistry**, v. 190, p. 922 – 927, 2016.

TAVARES, T. G., CONTRERAS, M. M., AMORIM, M., MARTÍN-ÁLVAREZ, P. J., PINTADO, M. E., RECIO, I., MALCATA, F. X. Optimization, by response surface methodology, of degree of hydrolysis and antioxidant and ACE-inhibitory activities of whey protein hydrolysates obtained with cardoon extract. **International Dairy Journal**, v. 21, p. 926-933, 2011.

TSOU, M. J., KAO, F. J., TSENG, C. K., CHIANG, W. D. Enhancing the anti-adipogenic activity of soy protein by limited hydrolysis with Flavourzyme and ultrafiltration. **Food Chemistry**, v. 122, p. 243–248, 2010.

UHLIG, T., KYPRIANOU, T., MARTINELLI, F. G., OPPICI, C. A., HEILIGERS, D., HILLS, D., CALVO, X. R., VERHAERT, P. The emergence of peptides in the pharmaceutical business: from exploration to exploitation. **EuPA Open Proteomics**, v. 4, p. 58-69, 2014.

UNDERWOOD, P. C.; ADLER, G. K. The renin angiotensin aldosterone system and insulin resistance in humans. **Current Hypertension Reports**, v. 15, n. 1, p. 59–70, 2013.

VASCONCELLOS, F.C.S. **Produção e caracterização de um isolado proteico de soja, avaliação das atividades biológicas antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória das proteínas glicinina e  $\beta$ - conglucina e produção de um fitocosmético**, 2014. 95p. Tese (Doutorado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

VO, T-S., RYU, B., KIM, S-K. Purification of novel anti-inflammatory peptides from enzymatic hydrolysate of the edible microalgal *Spirulina maxima*. **Journal of Functional Foods**, v. 5, p. 1336-1346, 2013.

WAN MOHTAR, W.A.A-Q.I., HAMID, A.A., ABD-AZIZ, S. MUHAMAD, S.K.S., SAARI, N. Preparation of bioactive peptides with high angiotensin converting enzyme inhibitory activity from winged bean [*Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC.] seed. **Journal Food Science Technology**, n. 12, v. 51, p.3658-3668, 2014.

WANG, B., GONG, Y. D., LI, Z. R., YU, D., CHI, C. F., MA, J. Y. Isolation and characterisation of five novel antioxidant peptides from ethanol-soluble proteins hydrolysate of spotless smoothhound (*Mustelus griseus*) muscle. **Journal of Functional Foods**, v. 6, p. 176–185, 2014a.

WANG, F-J., YIN, X-Y., REGENSTEIN, J.M., WANG, J-Z. Separation and purification of angiotensin-I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from walnuts (*Juglans regia* L.) meal. **European Food Research Technology**, v. 242, p.911–918, 2016.

WIEM, A., SMAIL, A., WISSEM, M., FALEIRO, M., MIGUEL, M. Antioxidant, anti-inflammatory and anti-acetylcholinesterase activities of leaf, flower and seed aqueous extracts of *Lawsonia inermis* from Tunisia. **International Journal Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, p. 445-452, 2014.

WIRIYAPHAN, C.; CHITSOMBOON, B.; YONGSAWADIGUL, J. Antioxidant activity of protein hydrolysates derived from threadfin bream surimi byproducts. **Food Chemistry**, v. 132, p. 104 – 111, 2012.

XU, B.J., CHANG, S.K.C. A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 2, p. 159-166, 2007.

YU, W., FIELD, C.J., WU, J. Purification and identification of anti-inflammatory peptides from spent hen muscle proteins hydrolysate. **Food Chemistry**, v. 253, p. 101-107, 2018.

ZAREI, MOHAMMAD, EBRAHIMPOUR, A., ABDUL-HAMID, A., ANWAR, F., BAKAR, F. A., PHILIP, R., SAARI, N. Identification and characterization of papain-

generated antioxidant peptides from palm kernel cake proteins. **Food Research International**, v. 62, p. 726–734, 2014.

ZHANG, J., ZHANG, H., WANG, L., GUO, X., WANG, X., YAO, H. Antioxidant activities of the rice endosperm protein hydrolysate: identification of the active peptide. **European Food Research and Technology**, v. 229, p. 709-719, 2009.

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

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, v. 64, p. 555 – 559, 1999.

ZHUANG, Y., SUN, L. Preparation of reactive oxygen scavenging peptides from tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin gelatin: optimization using response surface methodology. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 3, 2011.