

Angélica Lorenzetti

Efeito do ultrassom na hidrólise enzimática das proteínas do soro
lácteo e disponibilidade *in vitro*

Dissertação submetida ao Programa de
Pós Graduação da Universidade
Federal de Santa Catarina para a
obtenção do grau de mestre em
Engenharia de Alimentos.
Orientador: Prof. Dr. José Carlos
Cunha Petrus
Coorientador: Prof. Dr. Katia
Rezzadori

Florianópolis
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Lorenzetti, Angélica

EFEITO DO ULTRASSOM NA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DAS PROTEÍNAS DO SORO LÁCTEO E DISPONIBILIDADE *IN VITRO*/ Angélica Lorenzetti; orientador, José Carlos Cunha Petrus, coorientador, Katia Rezzadori, 2018. 98 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Engenharia de Alimentos. 2. Hidrólise enzimática. 3. Uso de ultrassom como pré-tratamento. I. Cunha Petrus, José Carlos. II. Rezzadori, Katia. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. IV. Título.

**“EFEITO DO ULTRASSOM NA HIDRÓLISE
ENZIMÁTICA DAS PROTEÍNAS DO SORO LÁCTEO E
DISPONIBILIDADE *IN VITRO*”**

Por

Angélica Lorenzetti

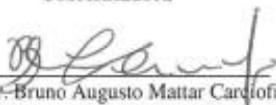
Dissertação julgada para obtenção do título de **Mestre em Engenharia Alimentos**, área de Concentração de **Desenvolvimento de Processos da Indústria de Alimentos**, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.



Prof. Dr. José Carlos Cunha Petrus
Orientador



Dra. Kátia Rezzadori
Coorientadora

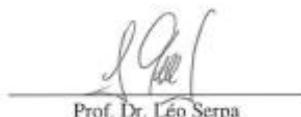


Prof. Dr. Bruno Augusto Mattar Cardofo
Coordenador

Banca Examinadora:



Prof. Dr. José Carlos Cunha Petrus



Prof. Dr. Léo Serpa



Profa. Dra. Débora de Oliveira



Dra. Manuela Balen

Florianópolis, 22 de fevereiro de 2018.

Este trabalho é dedicado a meus pais,
Valdir e Tercília, pelo suporte prestado durante
todo tempo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela constante presença na minha vida.

Agradeço aos meus orientadores Prof. Dr. José Carlos Cunha Petrus e Prof. Dr. Kátia Rezzadori pela confiança depositada, pelos ensinamentos e por toda orientação nesse trabalho.

Aos meus pais, Valdir e Tercília Lorenzetti, por todo apoio, por acreditarem em mim, pelo incentivo, paciência e compreensão.

Aos meus irmãos Gelson, Geovane e Eliane por estarem ao meu lado mesmo na distância e a todos os meus familiares que sempre torceram por mim.

Ao meu amor Gustavo, pelo carinho, compreensão, boa companhia, cumplicidade, amor e apoio oferecidos.

À Cristiana, Giordana, Lídia, Nely, Paulia e Tatiana pelo apoio e ensinamentos nos experimentos.

Aos amigos do LABSEM que me acolheram e estiveram presentes e dispostos a ajudar nestes dois anos de mestrado, com certeza o melhor laboratório do sul do mundo!

Aos amigos que estiveram do meu lado, incentivando, ajudando, perguntando e apoiando.

Aos laboratórios LABSEM, CEBIME, LATESC, LABCAL e LFC.

À UFSC e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos pela estrutura oferecida para que eu pudesse desenvolver a pesquisa e adquirir conhecimento através das disciplinas cursadas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

A todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho, e que contribuíram à minha formação profissional e pessoal.

A menos que modifiquemos à nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo. (Albert Einstein)

RESUMO

As propriedades do soro lácteo vêm despertando interesse da indústria e de pesquisadores. Na literatura encontram-se trabalhos sobre a hidrólise enzimática do soro utilizando-se enzimas purificadas, o que, industrialmente se torna inviável devido ao alto custo destas enzimas. Neste sentido, o presente trabalho tem como principal objetivo utilizar enzimas de grau comercial, de fácil disponibilização, visando obter hidrolisados proteicos de soro lácteo. Os experimentos foram realizados em reatores com volumes variáveis, com tempos de hidrólise de até 24 horas, variando-se temperatura, pH, tipos de enzima, uso ou não de pré-tratamento por sonda ultrassônica, concentração de enzima e concentração de substrato. Utilizaram-se as enzimas pepsina, papaína, queratinase e Savinase®. Planejamentos experimentais foram utilizados para identificar o efeito das variáveis do processo, bem como das possíveis interações entre elas na eficiência da hidrólise. Realizaram-se, também, estudos da estrutura da proteína após exposição ao ultrassom. O maior grau de hidrólise ocorreu com a utilização da pepsina, em 10 horas de processo, 37 °C e pH 2,5 em solução aquosa. Nesse mesmo ensaio, com a aplicação do ultrassom, o tempo foi reduzido para 6 horas. As análises de conformação das proteínas mostraram que a estrutura terciária não sofreu alteração pela ação do ultrassom. Entretanto, verificou-se uma redução no tamanho das partículas, facilitando a ação da enzima, melhorando, conseqüentemente, o grau de hidrólise. Estudos de biodisponibilidade *in vitro* evidenciaram que os peptídeos podem ser absorvidos sem necessidade de maior grau de hidrólise. Estes estudos permitiram um melhor entendimento sobre o processo de hidrólise enzimática do isolado proteico do soro lácteo para uma melhor utilização e otimização das condições deste processo.

Palavras-chave: Hidrolisado de soro lácteo, Papaína, Pepsina, Ultrassom

ABSTRACT

The properties of whey have been attracting interest from industry and many researchers. In the literature there are several studies about enzymatic hydrolysis of whey. However, using purified enzymes, which, industrially, becomes unfeasible due to the high cost of these enzymes. In this sense, the main objective of this work is to use low purity enzymes, which are readily available, in order to obtain whey protein hydrolyzates. The experiments were carried out in reactors with variable volumes, with hydrolysis for times up to 24 hours, varying temperature, pH, enzyme, use or not of pretreatment by ultrasonic probe, enzyme concentration and substrate concentration. The enzymes pepsin, papain, keratinase and Savinase® were used. Experimental design (DOE) were used to identify the effect of process variables as well as possible interactions between them on hydrolysis efficiency. Protein structure studies were also performed after exposure to ultrasound. The highest hydrolysis degree occurred with the use of pepsin, in 10 hours of process, 37 °C and pH 2.5 in aqueous solution. In that same test, with the application of ultrasound, the time reduced for 6 hours. The protein conformation analyzes showed that the tertiary structure was not altered by the action of the ultrasound. However, a reduction in particle size has been observed, facilitating the action of the enzyme, thereby improving the hydrolysis degree. In vitro bioavailability studies have shown that peptides can be absorbed without the need for a higher hydrolysis degree. These studies allowed a better understanding of the enzymatic hydrolysis process of whey protein isolate for a better use and optimization of the conditions of this process.

Keywords: whey protein hydrolyzate, papain, pepsin, ultrasound.

Sumário

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	OBJETIVO GERAL	18
1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1	SORO LÁCTEO	19
2.2	PROTEÍNAS DO SORO LÁCTEO	20
2.2.1	β -lactoglobulina	21
2.2.2	α -lactoalbumina	21
2.2.3	Outras proteínas do soro lácteo	22
2.3	HIDRÓLISE DE PROTEÍNAS	23
2.3.1	Papaína	25
2.3.2	Pepsina	25
2.3.3	Queratinase	26
2.3.4	Savinase®	26
2.3.5	Uso de proteases na hidrólise de soro lácteo	27
2.4	ULTRASSOM	29
2.5	DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS E CARACTERIZAÇÃO	31
2.5.1	Determinação do grau de hidrólise-Método de Sorensen	31
2.5.2	Espectrometria de massa	33
2.5.3	Fluorescência	33
2.5.4	Difração a laser	34
3	MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1	MATERIAIS	34
3.2	PROCESSO DE HIDRÓLISE	35
3.2.1	Definição das enzimas	37
3.2.2	Definição das condições de processo	38
3.2.3	Hidrólise enzimática	39

3.3 PRÉ-TRATAMENTO COM ULTRASSOM	39
3.4 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS E CARACTERIZAÇÃO DO HIDROLISADO	40
3.4.1 Caracterização química do IPS.....	40
3.4.2 Determinação de grau de hidrólise (GH) - Método de Sorensen 40	
3.4.3 Simulação gastrointestinal – biodisponibilidade	40
3.4.4 Atividade enzimática das proteases	42
3.4.5 Espectrometria de massa	43
3.4.6 Análise da estrutura da proteína antes e depois da aplicação do ultrassom.....	43
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ISOLADO PROTEICO DE SORO LÁCTEO	44
4.2 ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	45
4.3 DEFINIÇÃO DAS ENZIMAS	46
4.4 DEFINIÇÃO DAS CONDIÇÕES DE TRABALHO (pH E TEMPERATURA).....	47
4.5 PROCESSO DE HIDRÓLISE	50
4.5.1 Pepsina	50
4.5.2 Papaína.....	55
4.6 APLICAÇÃO DO ULTRASSOM COMO PRÉ-TRATAMENTO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	57
4.6.1 Pepsina	58
4.6.2 Papaína.....	59
4.7 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS E CARACTERIZAÇÃO DO HIDROLISADO	62
4.7.1 Espectrometria de massa.....	62
4.7.2 Biodisponibilidade.....	68
4.7.3 Análise da estrutura da proteína após o ultrassom.....	70

3 CONCLUSÃO	73
4 BIBLIOGRAFIA	74

1 INTRODUÇÃO

O Brasil tem destaque mundial na produção de alimentos. A produção anual de leite em 2016 foi estimada pela Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB em 35 bilhões de litros, 22% dessa produção é destinada à fabricação de queijos, gerando em torno de 761 mil toneladas de queijo produzidas.

A produção de queijo gera resíduos líquidos em grande quantidade, cada quilo de queijo produzido resulta em aproximadamente 9 litros de soro lácteo. Esse soro nem sempre é tratado como um subproduto, muitas vezes ocorre seu descarte como resíduo sem nenhum reaproveitamento, podendo gerar uma grande contaminação ambiental. Quando não é destinado a estações de tratamento de resíduos, em comparação com o esgoto doméstico, o soro lácteo é aproximadamente 100 vezes mais poluente, com carga de demanda química de oxigênio (DQO) próxima a 35000 mg/ml contra os 350 mg/ml do esgoto doméstico, figurando como alto potencial poluidor (CARVALHO; PRAZERES; RIVAS, 2013).

O soro lácteo é composto por aproximadamente 94% de água, 0,8% de proteínas e o restante de outras moléculas. Para tornar esse soro em um concentrado proteico o método mais utilizado na indústria atualmente é a ultrafiltração (INMETRO, 2017), a qual utiliza membranas com poros que permitem a passagem de moléculas de determinados tamanhos (LUZ, 2016). Conforme a concentração de proteínas no produto obtido, este será classificado como concentrado, entre 35 a 89% de proteínas ou isolado, caso apresentar mais de 90% de proteínas. O alto valor biológico apresentado nesse produto vem da presença de aminoácidos de cadeia ramificada, tendo importância como suplementos para atletas e convalescentes, além de vasta aplicação na indústria alimentícia como emulsificante, estabilizante, entre outros.

As proteínas do soro também são comercializadas isoladas. As duas principais são a albumina e a globulina, que representam entre 60-80% das proteínas do soro. A albumina do soro bovino (ASB), as imunoglobulinas (IG's) e os glicomacropéptidos (GMP) constituem o restante das proteínas, todas apresentam alto valor biológico e podem ser adquiridas isoladamente (HARAGUCHI; ABREU; PAULA, 2006). Outra forma de consumo destas é parcialmente hidrolisada. Para obtê-las utilizam-se processos químicos ou enzimáticos, os quais rompem algumas das ligações das proteínas formando peptídeos de melhor absorção.

A hidrólise enzimática é uma importante forma de obtenção desses peptídeos. Alguns estudos demonstram como aumentar a velocidade dessa reação e como obter moléculas com massas específicas, conforme desejado (AMBROSI et al., 2016; POULSEN et al., 2016). Outros estudos empregam novas tecnologias, visando sempre melhorar a quebra das moléculas de proteína. Esses trabalhos costumam empregar enzimas purificadas, que apresentam alto custo de aquisição, o que pode ocasionar inviabilidade econômica da produção. Assim, o uso de enzimas industriais com níveis de pureza menores, mas com preços muito menores também, poderia reduzir o custo do processo. Na literatura há poucos trabalhos que reportam o uso de enzimas industriais para hidrólise parcial de soro lácteo, por isso, existem várias lacunas que podem ser exploradas nesse campo de pesquisa.

O objetivo desse estudo foi obter uma solução de isolado proteico de soro lácteo parcialmente hidrolisado. Para isso foram estudados parâmetros de processo como o tipo e concentração da enzima, pH e temperatura empregados e o uso ou não de pré-tratamentos, sendo avaliado o produto obtido. Foram feitos, ainda, estudos sobre a disponibilidade *in vitro* dos peptídeos.

1.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito de variações na produção de hidrolisado proteico de soro lácteo.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) estudar a eficiência de enzimas proteolíticas na hidrólise do isolado proteico do soro;
- b) definir as condições do processo de hidrólise para cada enzima;
- c) melhorar o GH através da variação dos parâmetros de processo;
- d) avaliar o ultrassom como pré-tratamento na hidrólise do isolado proteico do soro lácteo;
- e) avaliar as alterações estruturais na proteína após o uso do ultrassom;
- f) caracterizar as soluções hidrolisadas com relação ao perfil peptídico;
- g) estudar a biodisponibilidade *in vitro* das soluções hidrolisadas que apresentaram maior GH no decorrer do estudo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 SORO LÁCTEO

A produção de leite no Brasil, em 2015, foi de aproximadamente 34 bilhões de litros. Desse volume, 24 bilhões de litros foram destinados a indústrias. Do leite inspecionado e processado, 54% foram embalados como leite fluido, leite em pó, iogurtes e sobremesas, enquanto 46% (11 bilhões de litros) foram transformados em queijos (ABIQ, 2016).

Da produção de queijos utilizando processo enzimático resulta o soro doce, que apresenta pH entre 6 e 7, este é resultante da aplicação da enzima quimosina. O soro doce representa cerca de 80% a 90% do volume de leite utilizado e retém 55% dos nutrientes do leite, sendo em média, 5% de lactose, 0,8% de proteínas solúveis, 0,1% de lipídios, 0,5% sais minerais e 10% do extrato seco. (GAJO et al, 2016)

O soro lácteo foi por muitos anos considerado apenas um efluente da indústria de queijos, gerando um sério problema ambiental, em virtude da alta carga orgânica apresentada. Os valores citados na literatura variam entre 30.000 e 60.000 mg.L⁻¹ para demanda biológica de oxigênio (DBO) e representa 50.000 mg.L⁻¹ de demanda química de oxigênio (DQO) (ALVES, 2005; ANDRADE, 2005; BALDASSO, 2008).

Atualmente, aproximadamente metade da produção mundial de soro é utilizada para produção de outros produtos, como ricota, bebidas lácteas, isolados proteicos ou para alimentação animal, porém o restante costuma ser descartado em corpos hídricos sem o devido tratamento, o que além de representar um problema ambiental, gera desperdício de nutrientes, uma vez que retém aproximadamente 55% dos nutrientes do leite (PORTO; SANTOS; MIRANDA, 2005).

Um dos empregos do soro lácteo sobressalente na indústria é na produção de concentrados e isolados proteicos. Muito utilizados para suplementação esportiva, apresentam alto valor nutricional, em virtude do alto teor de aminoácidos essenciais e de cadeia ramificada, e ampla aplicação na indústria devido à capacidade de solubilização em ampla faixa de pH, ação gelificante e retenção de água, formação de espumas e emulsões.

O processo mais utilizado para obtenção de proteínas concentradas de soro lácteo é a ultrafiltração, operação na qual o soro é submetido a uma membrana semipermeável e seletiva, que permite a passagem de moléculas de menor massa molecular como lactose, sais minerais e vitaminas, mantendo no retido em torno de 50 a 75% de

proteínas. Após a concentração é necessário secar o produto, para isso normalmente é utilizado processamento por *spray dryer*. Por apresentar um tempo curto de processo, o *spray dryer* permite que o calor não prejudique as propriedades nutricionais do produto. A liofilização também pode ser usada nessa etapa, mas apresenta maior custo de processo (INMETRO, 2017).

2.2 PROTEÍNAS DO SORO LÁCTEO

As proteínas do soro lácteo são altamente digeríveis e rapidamente absorvidas pelo organismo, estimulando a síntese de proteínas sanguíneas e teciduais, o que classifica essas proteínas como proteínas de metabolização rápida, muito adequadas para situações de estresses metabólicos em que a reposição de proteínas no organismo torna-se emergencial.

As proteínas do soro lácteo apresentam estrutura globular contendo algumas pontes de dissulfeto que conferem um grau de estabilidade estrutural. A maioria dessas proteínas apresentam elevada hidrofobicidade e cadeias peptídicas densamente dobradas. Os dois componentes principais das proteínas do soro são α -lactoalbumina e β -lactoglobulina (PATEL, 2015). Outras frações presentes no soro são a albumina do soro bovino (BSA), imunoglobulinas (Ig's) e glicomacropéptídeos (GMP). Essas frações podem variar em tamanho, peso molecular e função, fornecendo às proteínas do soro características especiais (HARAGUCHI; ABREU; PAULA, 2006).

As proteínas solúveis do soro possuem peptídeos bioativos contendo alto teor de aminoácidos essenciais, especialmente os de cadeia ramificada, tais como leucina, isoleucina e valina, que estão relacionados com fatores de crescimento, reconstrução e reparação muscular (HARAGUCHI et al., 2006). A composição média de aminoácidos (mg aa/g proteína) é: triptofano, cisteína, glicina, histidina, arginina, fenilalanina, metionina, glutamina, tirosina, asparagina, serina, prolina, treonina, isoleucina, valina, alanina, lisina, ácido aspártico, leucina e ácido glutâmico (HARAGUCHI; ABREU; PAULA, 2006).

Comercialmente, as proteínas de soro lácteo podem ser encontradas de três formas: isolado, quando contém acima de 90% de proteína, concentrado, entre 35 e 89% de proteína além de gordura e lactose e hidrolisado, forma parcialmente digerida da proteína. Muitos benefícios do consumo dessas proteínas são conhecidos, tais como efeito antioxidante e anti-inflamatório, anti-obesidade, anticancerígeno, imunomoduladores e redução da pressão arterial (PATEL, 2015).

Em relação aos aspectos nutricionais e fisiológicos, as proteínas do soro podem ser utilizadas em diversos suplementos, na forma nativa ou pré-digeridas, como por exemplo, na formulação de hidrolisados proteicos para pacientes com várias síndromes de má absorção intestinal e com intolerância as proteínas do leite, para idosos, atletas, dietas de controle de peso e para pacientes fenilcetonúricos (BIASUTTI, 2006).

2.2.1 β -lactoglobulina

A β -lactoglobulina é o peptídeo mais presente no soro (45,0% a 57,0%). Representando, no leite bovino, aproximadamente 3,2 g/L, é abundante no leite de ruminantes e suínos, não sendo encontrada em quantidade semelhantes no leite de outros animais. Apresenta massa molar média de 18,4 a 36,8 kDa, o que lhe confere resistência à ação de ácidos e enzimas proteolíticas presentes no estômago, sendo, portanto, absorvida no intestino delgado (BIASUTTI, 2006). É o peptídeo que apresenta maior teor de aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA), com aproximadamente 25,1%. Embora seja importante carreadora de retinol (pró vitamina A) materno para o filhote, em animais, em seres humanos essa função biológica é desprezada, uma vez que a β -lactoglobulina não está presente no leite humano (BRASIL, 2003).

A β -lactoglobulina tem na sua estrutura primária 162 aminoácidos e ponto isoelétrico de 5,2. Possui cinco resíduos de cisteína, sendo que quatro estão envolvidos em duas ligações dissulfeto que contribuem para a estrutura terciária da proteína (BIASUTTI, 2006).

A alergenicidade atribuída às proteínas do leite está, essencialmente, associada à β -lactoglobulina, e afeta aproximadamente 2% de crianças com menos de 2 anos, sendo algo compreensível, pois se trata de uma proteína inexistente no leite humano (BIASUTTI, 2006). Os relatos de alergia às proteínas do leite têm aumentado nos últimos anos, e pesquisas vêm mostrando que a forma como esses alimentos são preparados pode amenizar ou aumentar o potencial alergênico do alimento. O processo de hidrólise é um exemplo, pois pode afetar a conformação dessas proteínas diminuindo sua alergenicidade (RAHAMAN; VASILJEVIC; RAMCHANDRAN, 2016).

2.2.2 α -lactoalbumina

Em termos quantitativos, a α -lactoalbumina é o segundo peptídeo do soro do leite bovino (15 a 25%) e o principal do leite humano. Com

massa molar de 14,2 kDa, caracteriza-se por ser de fácil e rápida digestão. É rica em lisina, leucina, treonina e cistina. A α -lactoalbumina é precursora da biossíntese de lactose no tecido mamário e possui a capacidade de se ligar a certos minerais, como cálcio e zinco, o que pode afetar positivamente sua absorção. Além disso, a fração desta apresenta atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas, como por exemplo, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae* (BRASIL, 2003).

É rica em aminoácidos essenciais, principalmente o triptofano, um aminoácido precursor de niacina, vitamina hidrossolúvel, cujos derivados desempenham importante papel no metabolismo energético celular. Sua molécula é formada por 123 resíduos de aminoácidos, que são resistentes termicamente, pois conseguem se restaurar a baixas temperaturas (ALMEIDA et al, 2013).

Biologicamente, a α -lactoalbumina tem a função de regular a especificidade da galactosiltransferase na síntese da lactose, o que catalisa o último passo da biossíntese da lactose pelo substrato no tecido mamário (KINSELLA & WHITEHEAD, 1989). Comercialmente, tem aplicação em fórmulas infantis devido à similaridade com o leite humano.

2.2.3 Outras proteínas do soro lácteo

Além da α -lactoalbumina e da β -lactoglobulina existem aproximadamente sessenta proteínas no soro lácteo, entre as quais lipases e proteases e algumas que estão listadas a seguir:

- Imunoglobulinas: produzidas pelos linfócitos B, existem três classes no leite bovino: IgG, IgM e IgA, mediam as respostas imunológicas do corpo humano quanto a invasão de corpos estranhos ao organismo. Estruturalmente são compostas por duas cadeias de 23 kDa e duas cadeias de 53 kDa.

- Albumina do soro: aglomera-se no leite a partir do sangue, ligando-se aos ácidos graxos, mas se desconhece a sua função biológica. Estruturalmente é composta por 582 aminoácidos, com massa molar aproximada de 65 kDa.

- Lactoferrina: sintetizada pelos neutrófilos, possui cadeia de 689 aminoácidos e massa molar aproximado de 80 kDa. Sua presença é vista, além do leite, em secreções de glândulas exócrinas, no sistema digestivo, respiratório e reprodutor, no sangue e lágrimas. Trata-se de uma glicoproteína. Atua na defesa contra invasores patogênicos.

•Lactoperoxidase: estruturalmente é composta por 612 aminoácidos com uma massa molar de 78,4 kDa. Pertence à família das peroxidases, participando em reações oxidativas, em que o peróxido de hidrogênio é um dos reagentes, originando espécies reativas com atividade microbiana (TORRES, 2005).

2.3 HIDRÓLISE DE PROTEÍNAS

A hidrólise proteica tem importância em diversos processos industriais e na alteração das propriedades funcionais das proteínas, sendo utilizada para diminuir alergenicidade, melhorar a formação de espumas, estabilidade de produtos além de ajudar na conservação de valor nutricional (AMBROSI et al, 2016).

A hidrólise pode ocorrer por via enzimática ou química. A via química, alcalina ou ácida, apresenta algumas desvantagens, como o difícil controle da reação e formação de produtos com aminoácidos modificados. As condições de hidrólise ácida mais comuns costumam destruir o triptofano. A hidrólise alcalina pode reduzir o conteúdo de cistina, arginina, treonina, serina, isoleucina e/ou lisina e formar resíduos de aminoácidos incomuns, como a lisinoalanina ou a lantonina.

A hidrólise enzimática, por sua vez, ocorre em condições mais brandas, o que facilita o controle da reação e diminui a formação de produtos indesejados, pois normalmente evitam as reações secundárias, e não diminuem o valor nutricional das proteínas. A especificidade das enzimas permite que se desenvolva hidrolisados com características químicas e nutricionais melhor definidas (TAVANO, 2013).

A hidrólise enzimática é aplicada quando se deseja melhorar a disponibilidade dos peptídeos biologicamente ativos presentes nas moléculas de proteínas. Biopeptídeos são definidos como fragmentos específicos de proteína com impacto benéfico nas funções ou condições corporais que influenciam a saúde humana. Estes peptídeos podem apresentar boa variedade de atividades, tais como antimicrobiana, antitrombótica, anti-hipertensiva, atividades imunomoduladoras e antioxidante (ROCHA et al, 2017).

Conforme se eleva o grau de hidrólise (GH) das proteínas do soro lácteo, aumenta-se também sua solubilidade, facilitando a absorção e conseqüentemente a biodisponibilidade desses aminoácidos, tornando os produtos hidrolisados importantes para a nutrição de pacientes hospitalizados e desportistas (POULSEN et al, 2016). Entre as doenças

que necessitam dessa suplementação estão a Doença de Crohn, síndrome do intestino curto, pancreatite e síndromes de imunodeficiências.

Os hidrolisados de soro comercial podem ter até 30% de GH. O GH (%) elevado no hidrolisado proteico de soro lácteo pode ser indesejável devido ao aumento do número de peptídeos amargos, que podem limitar a utilização de soluções de soro. Além disso, o monitoramento do desenvolvimento do GH (%) é de grande valor em relação ao controle do processo na produção de ingredientes à base de proteína de soro. A amargura do hidrolisado é atribuída principalmente a quatro peptídeos principais, fenilalanina, tirosina, leucina e valina, que, por outro lado, possuem propriedades bioativas. Portanto, também trazem benefícios à saúde de quem os consome, por isso é importante manter um equilíbrio na quantidade presente desses peptídeos (POULSEN et al, 2016).

Para atender aos requisitos nutricionais, além de manter próximas às características da proteína original, os hidrolisados devem reunir as seguintes propriedades: sabor aceitável, com o menor amargor possível, equilíbrio osmótico e hipoalergenicidade (PACHECO et al, 2005).

Há diferentes tipos de peptidases, provenientes de fontes animais, vegetais e de microrganismos. De modo geral, essas enzimas hidrolíticas capazes de quebrar ligações peptídicas são renomeadas como proteinases quando se referem às endopeptidases, enzimas que clivam ligações peptídicas internas da molécula de proteína, ou exopeptidases quando clivam as porções amino ou carboxiterminal. As enzimas hidrolíticas que não se encaixam nesses dois perfis formam uma terceira classe EC 3.4.99 (RAWLINGS et al, 2014).

As propriedades resultantes da hidrólise dependem dos fatores utilizados no processo, da composição e do pré-tratamento aplicado ao substrato, do pH do meio reacional, da temperatura, da especificidade da enzima aplicada e do GH alcançado ao final do processo. Essas propriedades definem quais funcionalidades serão apresentadas. A quebra decorrente pode resultar em peptídeos com menores massas molares ou na exposição de grupos ionizáveis (TAMM; DRUSCH, 2017).

A variação do pH pode influenciar diretamente na solubilização do isolado proteico de soro lácteo (IPS), afetando a distribuição das cargas nas moléculas de proteínas e na eficiência da enzima, pois cada enzima apresenta um pH ótimo para sua atividade (PESSATO, 2014).

A escolha da enzima deve basear-se no produto que se deseja obter, cada enzima apresenta sua especificidade e capacidade de interação com o substrato. Existem diferentes enzimas que podem ser

usadas para a hidrólise das proteínas do soro lácteo, cada uma apresenta diferentes características e por isso é importante conhecê-las para fazer a escolha correta. As enzimas estudadas nesse trabalho são apresentadas a seguir com uma breve definição e seus principais usos.

2.3.1 Papaína

A papaína é uma protease de tiol presente no látex de *Carica papaya*, exibe ampla atividade proteolítica e é uma enzima de alto interesse em pesquisa, tendo também uma variedade de aplicações industriais.

A importância comercial da papaína é devido à sua forte atividade proteolítica contra uma ampla gama de substratos proteicos, além de se manter ativa em uma ampla gama de condições operacionais. Essas características permitiram que a papaína liderasse o mercado de proteases, ultrapassando outras plantas proteases derivada (LUCAS; CASTAÑEDA; HORMIGO, 2017). Na indústria alimentar, a papaína é utilizada para amaciar carnes e derivados relacionados, produção de hidrolisado de proteínas, clarificação na indústria cervejeira, produção de queijo na indústria de laticínios, na indústria de panificação e para extração de sabor e compostos de cor de plantas.

A papaína também pode ser utilizada na indústria forrageira, visando elevar o teor de proteínas e na recuperação de proteínas vegetais e animais empregados na produção de fármacos (HOMAEI et al, 2010).

2.3.2 Pepsina

A pepsina, constituída por 44 aminoácidos, é uma enzima digestiva, encontrada na maioria dos organismos conhecidos, tais como vírus, protozoários, plantas, invertebrados e vertebrados que tem como função a digestão das proteínas ingeridas. A pepsina também atua na ligação de seu sítio ativo às cadeias de proteínas, dividindo-se em frações menores.

A pepsina é uma proteína monomérica, com alta porcentagem de resíduos ácidos, justificando seu baixo ponto isoelétrico, favorecendo, assim, a hidrólise de ligações peptídicas entre dois aminoácidos hidrofóbicos. O sítio catalítico da pepsina é formado por dois resíduos de aspartato, um dos quais deve ser protonado e o outro desprotonado, para que a proteína seja ativa. Isso ocorre quando o pH varia entre 1 e 5. A atividade proteolítica da pepsina é afetada pelas condições do meio de

dissolução. Em meios de dissolução ácida, simulando o fluido gástrico (pH 1-3; 37 ° C), a pepsina mostra a sua máxima atividade (GUZMAN, 2016).

2.3.3 Queratinase

A queratina, proteína estrutural insolúvel e fibrosa, é abundante na natureza, encontrada como parte do cabelo, pena, unha, chifre, casco, escala e lã. As queratinases são enzimas proteolíticas especializadas que atacam os substratos de queratina altamente recalcitrantes. Além das proteases convencionais, as queratinases têm ampla especificidade para substratos ricos em queratina insolúveis. As queratinases apresentam grande utilidade em setores industriais, como reciclagem de penas, couro, têxteis, alimentos, fertilizantes e cosméticos (KOTHARI; RANI; GOYAL, 2017).

Estas enzimas são úteis para a bioconversão de resíduos de queratina em produtos para alimentação animal. Outras aplicações promissoras não alimentares continuam a ser identificados com o avanço de pesquisas, algumas dessas novas aplicações incluem desengordurantes enzimáticos para indústrias de couro e cosméticos, uso em detergentes (HADDAR et al., 2010) e bioprocessamento de fibras de queratina em biopolímeros úteis (BRANDELLI, 2008). Além disso, as queratinases apresentaram importância na melhora da chegada de medicamentos em alguns tecidos (MOHORCIC et al., 2007).

2.3.4 Savinase®

A Savinase®, pertencente às serinas proteases que ocorrem em praticamente todos os organismos, podem ser enzimas intracelulares ou extracelulares. Essas proteínas existem como duas famílias: a tripsina e a subtilisina. A Savinase® além de possuir massa molar próxima a 28 kDa, é um membro altamente alcalofílico da família secretada por *Bacillus lentus*. Consiste em 269 aminoácidos e a sequência do gene é conhecida (BETZEL et al., 1992).

Sua especificidade é muito ampla, apresentando estabilidade máxima na faixa de pH de 7 a 10 e alta atividade na faixa de 8 a 12, criando assim considerável interesse em sua utilização como aditivos degradantes de proteína para detergentes na indústria de lavagem de pó para a remoção de solos com presença elevada de proteínas.

Apresenta estrutura cristalográfica, possuindo dois íons de cálcio na estrutura, que são responsáveis pelo efeito estabilizador da subtilisina. O número relativamente elevado de pontes de sal provavelmente contribuiu para a sua alta estabilidade térmica e o caráter mais hidrofílico da região de ligação do substrato provavelmente contribuem para a atividade alcalina da enzima (BETZEL et al, 1992).

2.3.5 Uso de proteases na hidrólise de soro lácteo

O uso de diferentes enzimas proteolíticas para hidrólise de soro lácteo bovino é uma prática que tem sido amplamente utilizada nas pesquisas atuais. Na Tabela 1 é apresentado um compilado de trabalhos realizados recentemente nesta área destacando-se as principais enzimas utilizadas, bem como os principais resultados.

Tabela 1 – Trabalhos recentes encontrados na literatura referentes à hidrólise enzimática obtida por diferentes enzimas.

Referência	Enzimas utilizadas	O que foi feito	Resultados
ROCHA et al (2017)	Protease aspártica imobilizada de frutos de <i>Salpichroa organifolia</i>	1-Imobilização da enzima. 2-Hidrólise do soro lácteo por 20h. 3-Avaliação da atividade antioxidante.	A enzima imobilizada apresentou maior estabilidade térmica. O soro atingiu um grau similar de hidrólise com ambas as formas da enzima, entre 6-8%. O hidrolisado pode ser considerado como uma fonte promissora de antioxidantes.
AMBROSI et al (2016)	Quimotripsina e bromelina	Avaliar a aplicabilidade da alta pressão hidrostática (HHP) para auxiliar a hidrólise enzimática das proteínas.	O GH variou de 4 a 17%, num tempo de 30 min para diferentes pressões aplicadas. Quanto maior a pressão aplicada, maior o GH obtido.

POULSEN et al (2016)	Tripsina	Usou-se espectroscopia de meio-infravermelho para predição de hidrólise de proteína de soro.	O GH variou de 12 a 22% com 8 horas de hidrólise. Observou-se mudança nos resultados espectrais conforme o GH aumentava, mostrando que o método pode ser usado para acompanhar o avanço da hidrólise.
SHELLMAN et al. (2003)	Alcalase Debitrase HYW20	e Testou-se três métodos para quantificar o GH.	Após 6 horas de hidrólise obteu-se GH's entre 12 e 19%. O método baseado na variação de pH foi considerado o mais rápido e com melhores resultados, permitindo o monitoramento em tempo real do GH.
OTTE et al. (2007)	Tripsina, pepsina termolisina	e Buscou-se inibir a enzima conversora de angiotensina (ACE).	Os substratos de caseína deram origem a hidrolisados com inibição de ACE significativamente maior do que os substratos de proteína de soro. A maior atividade inibitória de ACE foi encontrada em hidrolisados feitos com termolisina.

Os trabalhos supracitados apresentaram grande variação de tempo e de GH obtidos, além de métodos utilizados para quantificar esse GH. Como a gama de enzimas utilizadas é bastante diversa a comparação direta entre elas não é possível. Mas pode-se observar que os valores

maiores de GH's obtidos ficam em torno de 20% de hidrólise em tempos maiores de 6 horas. Os tempos de hidrólise curtos apresentaram pouca hidrólise.

É importante destacar que as enzimas utilizadas nos estudos acima relacionados são de alto grau de pureza, destacando a necessidade de estudos com enzimas industriais nessa área. Além disso, para promover um maior GH tem sido proposto o uso de pré-tratamentos da solução de soro lácteo. Um desses pré-tratamentos é o uso de sonda ultrassônica que será abordada a seguir.

2.4 ULTRASSOM

O ultrassom é uma tecnologia limpa que vem ganhando espaço na indústria de alimentos. A energia ultrassônica em meio fluido leva a formação de pequenas bolhas, provocando agitação e melhorando a homogeneidade do meio. Esse movimento pode enfraquecer as interações proteicas e perturbar as estruturas quaternárias e terciárias da proteína (ZHOU et al, 2016).

O uso do ultrassom de alta intensidade, aplicação de ondas entre 20 e 100 kHz e intensidade entre 10 e 1000W vem ganhando importância na hidrólise enzimática assistida ou como pré-tratamento do substrato anteriormente à adição das enzimas por se tratar de um processo não térmico, evitando a deterioração de compostos e nutrientes do alimento (JIN et al, 2015; ZOU et al, 2016). A eficácia do uso de ultrassom em hidrólises enzimáticas já foi comprovada para várias proteínas, incluindo proteína isolada de aveia (WANG et al, 2014), clara de ovo (STEFANOVIĆ et al, 2014) e proteínas da membrana de casca do ovo (JAIN; ANAL, 2016).

Os efeitos das ondas ultrassônicas sobre as proteínas são complexos, podendo melhorar ou dificultar a ação hidrolítica nas proteínas dependendo das condições e intensidade em que é empregado, bem como da natureza da enzima (ULUKO et al, 2015).

Algumas pesquisas estão acontecendo empregando o pré-tratamento com ultrassom para melhorar a hidrólise das proteínas. Na Tabela 2, alguns desses trabalhos são apresentados.

Tabela 2 – Trabalhos referentes ao uso de ultrassom como pré-tratamento à hidrólise enzimática.

Referências	Enzima utilizada	O que foi feito	Resultados
GARCIA et al (2016)	Bromelina e papaina	Estudo do uso do ultrassom como pré tratamento.	O GH alcançado foi de 12 a 18%. O ultrassom exerceu um efeito significativo na proteólise. Aumentou a bioatividade dos hidrolisados, o que poderia melhorar o processo de hidrólise enzimática.
ULUKO et al (2015)	Tripsina e pepsina	Foi investigada a capacidade antioxidante do concentrado de proteína do leite hidrolisado após o pré-tratamento com calor, microondas e ultrassom.	O ultrassom foi o melhor pré-tratamento para aumentar a capacidade antioxidante, induziu a produção de peptídeos menos hidrofóbicos.
ZHOU et al (2017)	Protamex®	Investigou-se o efeito de pré-tratamentos de calor, ultrassom e combinações de calor / ultrassom e ultrassom / calor no farelo de glúten de milho.	O pré-tratamento com ultrassom melhorou a taxa de reação da enzima, melhorando o GH alcançado em até 50%.
JOVANOVIĆ, et al (2016)	Alcalase 2.4 L®	Avaliou-se o impacto do uso de ultrassom na reação de hidrólise na proteína do ovo quando comparado ao pré-tratamento térmico.	O uso do pré-tratamento melhorou a hidrólise, afetando o tamanho de partícula, a uniformidade e carga da amostra, fazendo com que se obtê-se GH de até 45%. O ultrassom mostrou-se mais eficiente que o

					calor.
SHEN et al (2017)	Não há	hidrólise		Determinou-se o efeito do ultrassom de alta intensidade em propriedades físico-químicas e emulsionantes das proteínas de soro lácteo agregadas termicamente	O tamanho das partículas foi diminuído. Teve redução significativa na turbidez. As propriedades reológicas e emulsionantes foram significativamente influenciadas pelo ultrassom.
MA et al (2017)		Pectinase		Os efeitos do pré-tratamento com ultrassom na hidrólise enzimática da pectina foram investigados.	Diminuiu significativamente a massa molar da pectina em 50%, ao passo que aumentou o GH para as reações enzimáticas em 20%.

Os trabalhos mostram um efeito positivo em diferentes objetivos de cada estudo com a aplicação do ultrassom. Na maioria das pesquisas mostradas na tabela, os objetivos buscados foram melhorados após o tratamento, resultados estes bastante diversos, desde aumento do GH até a redução do tamanho das partículas em uma solução. A ação da cavitação provocada pela sonda ultrassônica se mostrou uma facilitadora dos processos.

2.5 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS E CARACTERIZAÇÃO

Para caracterizar o produto obtido após a hidrólise enzimática, diferentes técnicas podem ser empregadas, de forma a abranger características diversas da solução obtida e melhor avaliá-la.

2.5.1 Determinação do grau de hidrólise-Método de Sorensen

O método com formol é muito aplicado para proteínas do leite e, dentro de certos limites, rende boas correlações entre proteína por Kjeldahl e proteínas por titulação após reação com formol. O método é baseado no princípio de que, na região de pH 8,3, grupos amino livres

das proteínas (-NH₂ terminal, -NH₂ da lisina e, até certo ponto, arginina) reagem com aldeído fórmico formando compostos amínicos e consequentemente liberam prótons.

Esse método é altamente correlacionado com o teor de proteína. O princípio do método consiste na reação do formaldeído com os grupos -NH₂ das proteínas, deslocando o equilíbrio químico no sentido da liberação de prótons, que estavam anteriormente ligados a esses grupos formando os grupos -NH₃⁺. Ao reagir com os grupos -NH₂, o formaldeído desloca o equilíbrio químico para manter a constante que governa tal equilíbrio. Os prótons liberados são neutralizados (titulados) com uma solução de hidróxido de sódio, formando uma correlação entre quantidade de proteína e quantidade de hidróxido de sódio gasta para neutralizá-los.

Durante o período de hidrólise retira-se alíquotas para determinação do GH, definido como a proporção de ligações peptídicas clivadas numa proteína hidrolisada. Para acompanhar a evolução da hidrólise foi monitorado o GH através da titulação com formaldeído, baseado no método de Sorensen (1907), utilizado atualmente para quantificar proteínas de peixes, de sementes oleoginosas, proteínas lácteas e hemoglobulina.

O cálculo para a quantidade de nitrogênio aminado é feito através da fórmula:

$$N_a = \frac{V_{NaOH} \times N_{NaOH} \times 0,014 \times 100}{P_{amostra}} \quad (1)$$

Onde: N_a é a quantidade de nitrogênio aminado, V_{NaOH} é o volume de hidróxido de sódio gasto na titulação e P_{amostra} é o peso de amostra.

Com esse valor de nitrogênio aminado pode-se calcular o GH da amostra:

$$GH = \frac{N_a}{N_t} \times 100 \quad (2)$$

Onde o N_t é o nitrogênio total presente na amostra, calculado através do método de Kjeldahl.

2.5.2 Espectrometria de massa

É uma técnica analítica que permite detectar e identificar moléculas de interesse por meio de sua massa molar e da caracterização da estrutura química, o que ocorre através da formação de íons de compostos orgânicos que são separados pela sua taxa de massa/carga (m/z) e assim detectados.

Uma das técnicas utilizadas é a MALDI-TOF-MS, ionização por dessorção de laser assistido por matriz, onde a amostra é analisada sobre uma placa de metal condutora bombardeada por breves pulsos de laser. Quando esta absorve a energia emitida pelo laser ocorre a transferência de prótons da matriz para os componentes da amostra e desencadeia-se o processo de dessorção que permite a mudança do estado sólido para o gasoso, esses compostos serão direcionados ao analisador TOF, acelerados através de um campo elétrico dentro de um tubo a vácuo, onde são separados de acordo com suas relações m/z (onde m é a massa e z a carga), chegando ao detector em tempos diferentes.

Para massas menores, até 4.000 a 5.000 Da, utiliza-se o método chamado Refletor positivo e para massas maiores, no caso entre 2.000 - 200.000 Da pode-se utilizar o método Linear positivo. A diferença entre os métodos são as voltagens utilizadas, que favorecem uma ou outra faixa de massas e o detector utilizado. No caso do método linear o detector fica posicionado de forma linear à fonte dos íons e no modo refletor os íons são redirecionados/refletidos para outro detector, o que aumenta o percurso destes íons no equipamento, favorecendo a sua separação e conseqüentemente uma melhor resolução. Outra diferença é a matriz utilizada para cristalizar as amostras e permitir a sua ionização. O tipo de matriz também varia de acordo com o método (modo linear ou refletivo) e conseqüentemente para o tipo de massa que se deseja detectar.

2.5.3 Fluorescência

A técnica da fluorescência se baseia no fato de que quando a energia da luz é absorvida, a molécula passa de um nível de energia mais baixo para um mais alto, ficando excitada. Para voltar a sua estabilidade ela emite luz (fluorescência), como parte da energia é perdida, a luz emitida terá menos energia (maior comprimento de onda) que a luz absorvida. Assim, a luz de fluorescência terá sempre um

comprimento de onda maior que a luz de excitação. Se existirem diferentes absorvedores, a luz emitida será composta de diferentes comprimentos de onda (todos maiores que aqueles da luz absorvida); a probabilidade de decaimento do primeiro estado excitado para cada nível vibracional do estado fundamental determina a forma do espectro de fluorescência.

Para proteínas, há somente três fluoróforos intrínsecos – triptofano, tirosina e fenilalanina, que indicam como está a estrutura terciária dessa. Na prática, a fluorescência do triptofano é a mais comumente estudada, porque a fenilalanina tem uma energia muito baixa e a fluorescência da tirosina é frequentemente muito baixa devido à supressão. Quando a molécula está bastante enovelada os aminoácidos devem estar em uma região interna da proteína e cercados por aminoácidos não polares, o espectro de um destes aminoácidos mostra picos de menor intensidade do que se essa estrutura estiver mais solta, com os aminoácidos mais livres. Com isso pode-se analisar se a estrutura da proteína foi afetada, teve suas interações enfraquecidas e o contato com os aminoácidos facilitado.

2.5.4 Difração a laser

Para uma análise macroscópica das proteínas pode fazer o uso da difração a laser, uma técnica amplamente utilizada na determinação do tamanho de partículas. A difração a laser mede as distribuições de tamanho das partículas por medição da variação angular na intensidade da luz difundida à medida que um feixe de laser interage com as partículas dispersas da amostra. Partículas grandes dispersam a luz em pequenos ângulos em relação ao feixe de laser e partículas pequenas dispersam a luz em ângulos grandes. Os dados sobre a intensidade da dispersão angular são então analisados para calcular o tamanho das partículas responsáveis por criar o padrão de dispersão, com base na teoria de difusão da luz de Mie (MEDENDORP, et al., 2015).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

O isolado proteico de soro lácteo foi adquirido no comércio local - Farmácia de manipulação Vita Farma, Florianópolis, SC. Laudo

técnico acompanhou o produto com indicação de sua composição básica. Foram realizados testes confirmatórios no LABCAL-UFSC.

A enzima queratinase, de nome comercial Cibenza DP100®, da empresa NOVUS (Indaiatuba, SP), a Savinase® da empresa Novozymes (Copenhague, Dinamarca) e a papaína, nome comercial Brauzyn 100®, da empresa Prozyn, (Butantã, SP). A pepsina foi adquirida da Neon Comercial (Suzano, São Paulo).

Os reatores para a hidrólise foram projetados e construídos especialmente para esse projeto, pela Eco Educacional (Florianópolis, SC). O sonicador de ponteira ultrassônico usado como pré-tratamento, foi adquirido da Eco-sonics (modelo QR500, Indaiatuba, SP).

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

3.2 PROCESSO DE HIDRÓLISE

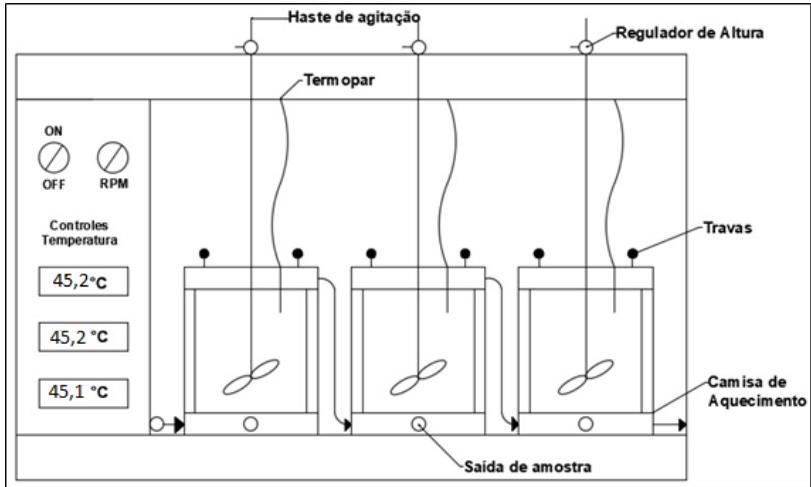
Para hidrólise foi utilizado o equipamento da Figura 1, composto de três reatores encamisados, com temperatura da camisa controlada por banho termostático e indicada digitalmente em cada reator através de termopar. O reator possui agitação mecânica variável e sistema de fechamento seguro evitando-se perda de produto ou contaminação externa.

Figura 1 – Fotografia dos reatores com controle de temperatura e agitação, utilizados nos experimentos de hidrólise.



Um esquema da estrutura dos reatores, é mostrado na Figura 2.

Figura 2 – Estrutura do reator utilizado.

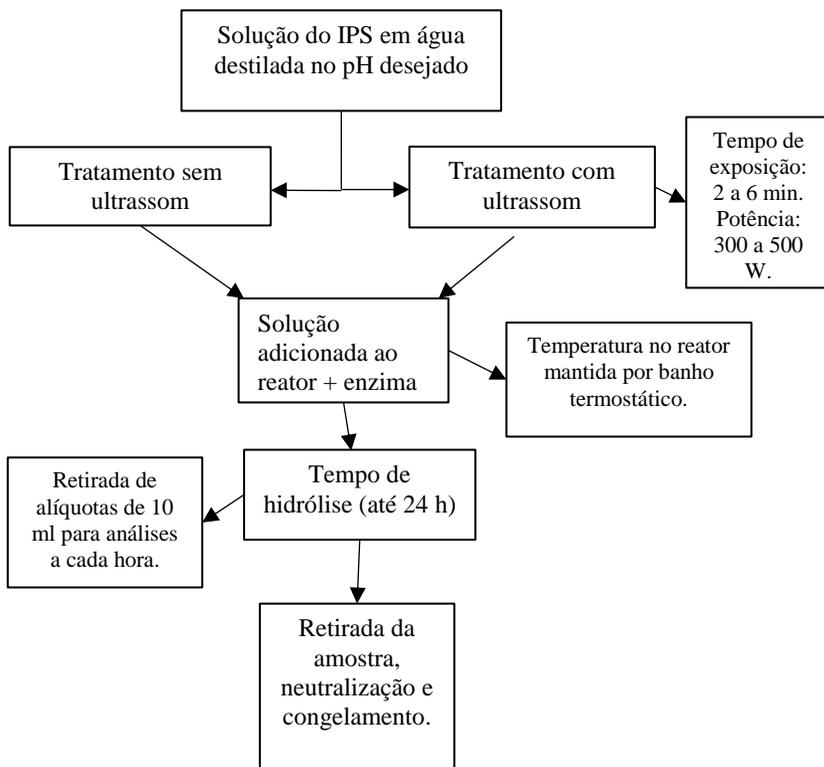


A reação de hidrólise ocorreu com a adição do IPS dissolvido em água destilada, na concentração e pH de estudo, ajustado com hidróxido de sódio 0,1M ou ácido cítrico 1M, e da enzima estudada. A temperatura do banho era regulada e controlada através do visor digital ligado a cada termopar submerso na solução.

Mantinha-se uma agitação de 120 rpm durante todo o processo, retirando-se alíquotas para análises em tempos pré-determinados. Ao final do período de hidrólise, o hidrolisado era retirado através de válvulas na base de cada reator, neutralizado e congelado.

Na Figura 3 é mostrado um esquema do processo de hidrólise.

Figura 3 - Esquema simplificado do processo de hidrólise.



3.2.1 Definição das enzimas

Para realização do estudo analisaram-se quatro enzimas: queratinase, papaína, pepsina e Savinase®. O objetivo era escolher 2 enzimas que apresentassem melhores desempenhos no GH do IPS. A escolha das enzimas se baseou nos relatos da literatura sobre afinidade enzimática e aplicabilidade em soro lácteo. Além disso, foi realizado um teste comparativo mantendo-se as condições descritas como melhores pelos fabricantes - pH e temperatura - em um processo de hidrólise por um período de 24h. A cada 6 horas foram coletadas amostras e determinou-se o GH pelo método de Sorensen (Item 2.5.1).

Tabela 3 – Condições de processo durante a hidrólise do IPS

	Queratinase	Papaína	Pepsina	Savinase®
Temperatura (°C)	65,0	55,0	37,0	50,0
pH	6,5	6,0	2,5	7,0

3.2.2 Definição das condições de processo

A partir dos resultados obtidos no item 3.2.1 foram escolhidas as enzimas pepsina e papaína. Para se ter a melhor atividade das enzimas e obter um GH maior, fez-se planejamentos experimentais de forma a definir as condições de pH e temperatura a serem utilizados durante o processo.

As condições ótimas da pepsina são equivalentes as do corpo humano, e pequenas variações nestes parâmetros já causam perda de sua atividade. Portanto, para esta enzima não foi realizado um estudo das condições operacionais e definiu-se, então, a temperatura de 37 °C e pH 2,5.

Para a papaína fez-se um planejamento fatorial completo 2³ (com triplicata no ponto central), variando temperatura, pH e a relação enzima/substrato de acordo com o recomendado pelo fabricante como melhores condições de trabalho. Para avaliar a melhor condição, analisou-se como resposta o GH obtido, através de medidas com 1, 5 e 10 horas de reação.

Tabela 3 - Valores utilizados no planejamento fatorial completo 2³ (com triplicata no ponto central) para a papaína.

Níveis/Parâmetros	T (°C)	E/S (%)	pH
-1	50	1,5	5
+1	70	3,5	7
0	60	2,5	6

3.2.3 Hidrólise enzimática

Tendo definido as condições de processo (pH e T) de cada enzima, fez-se um novo estudo, através de planejamento experimental, agora para definição dos melhores níveis de concentração de enzima e de substrato na solução de reação.

O planejamento experimental para ambas as enzimas foi feito através de um planejamento fatorial completo 2^2 com três pontos centrais, variando as concentrações de substrato e enzima, utilizando como resposta o GH. Para essa etapa aplicou-se as condições de pH e temperatura constantes definidas anteriormente de acordo com cada enzima.

Tabela 4 - Valores utilizados no planejamento fatorial completo 2^2 (com triplicata no ponto central) para as enzimas papaína e pepsina.

Parâmetros	Papaína		Pepsina	
	Enzima (g)	Substrato (g)	Enzima (g)	Substrato (g)
-1	0,2	2	0,05	4
0	0,6	5	0,275	8
+1	1	8	0,5	12

3.3 PRÉ-TRATAMENTO COM ULTRASSOM

Visando melhorar os resultados obtidos na hidrólise enzimática do IPS foi aplicado um pré-tratamento com sonda ultrassônica. Para isso a solução aquosa de IPS, sempre no volume de 50 ml, nas condições desejadas, era submetida ao ultrassom variando a potência e o tempo de exposição, sendo que a potência máxima do equipamento é de 500 W, seguindo um planejamento fatorial completo 2^2 com os parâmetros descritos na Tabela 5. Após isso era realizada a hidrólise como descrito anteriormente no item 3.2.

Tabela 5 - Valores utilizados no planejamento fatorial completo 2^2 (com triplicata no ponto central) da sonda ultrassônica.

Parâmetros	Potência (W)	Tempo (min)
-1	300	2
0	400	4
+1	500	6

3.4 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS E CARACTERIZAÇÃO DO HIDROLISADO

3.4.1 Caracterização química do IPS

A composição química do soro lácteo foi determinada segundo os métodos descritos na AOAC (1995) no Laboratório de análises LABCAL (Florianópolis,SC). As cinzas foram determinadas por incineração, em mufla a 550 °C; os lipídeos, por extração com éter etílico (Quimis Q-308G26, Diadema, SP); as proteínas foram determinadas pelo método de macro-Kjeldahl; e a lactose, por diferença. O fator de conversão de nitrogênio para proteína usado foi 6,38 (NIELSEN,1998).

3.4.2 Determinação de grau de hidrólise (GH) - Método de Sorensen

Para determinar o GH da amostra, uma alíquota de 10 ml de amostra era retirada de dentro do reator durante o processo a cada uma hora. Seu pH era ajustado para 8,3, adicionado 10 ml de uma solução de clorofórmio 37% v/v adicionado de fenolftaleína 0,05% v/v e essa mistura era titulada com NaOH 0,1 M até a viragem de cor para róseo.

Com esse volume gasto na titulação eram realizados os cálculos e obtido o GH naquele momento.

3.4.3 Simulação gastrointestinal – biodisponibilidade

Seguindo a metodologia de Verruck et al. (2017), cinco amostras foram submetidas a simulação das condições gastrointestinais. Essas amostras foram selecionadas por apresentarem os maiores valores

de GH segundo estudos realizados anteriormente. Assim, para o estudo da biodisponibilidade as seguintes amostras foram selecionadas: IPS solubilizado em água (amostra 1/padrão), amostra hidrolisada por 6 horas de IPS a 8% e pepsina a 1% (amostra 2), amostra hidrolisada por 6 horas de IPS a 8% e pepsina a 1% submetida ao sonificador ultrassônico (amostra 3), amostra hidrolisada por 6 horas de IPS a 8% e papaina a 1% (amostra 4), amostra hidrolisada por 6 horas de IPS a 8% e papaina a 1% submetida ao sonificador ultrassônico (amostra 5).

As condições típicas prevalentes na boca humana, esôfago/estômago, duodeno e íleo foram sequencialmente simuladas. Os parâmetros (soluções enzimáticas, valores de pH, período de tempo e intensidades de agitação em cada parte do sistema digestivo humano) usados para simular o processo estão descritos na Tabela 7.

Para representar a temperatura e a intensidade dos movimentos peristálticos em cada parte do sistema digestivo humano, usou-se um banho de água termostático (Dist DI950 M, Florianópolis, SC) a 37 ± 1 ° C com agitação mecânica, cujas intensidades se assemelham às atingidas em cada fase da digestão.

As amostras indicadas foram colocadas em tubos de vidro dentro do banho com agitação e submetidas primeiro à simulação de movimento de mastigação (boca) onde o pH foi ajustado para 6,9 com NaHCO_3 0,1M. Neste passo, uma solução simulando a saliva foi preparada com 100 U.mL^{-1} da α -amilase em 1 mmol.L^{-1} de CaCl_2 , desta foi adicionado $24 \text{ }\mu\text{L.min}^{-1}$ durante 2 min, com agitação a 200 rpm. No passo esôfago-estômago, o pH das amostras foi diminuído até atingir 2, utilizando HCl $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, ao mesmo tempo em que $50 \text{ }\mu\text{L}$ de uma solução de pepsina foi adicionada (25 mg.mL^{-1} em $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ de HCl) em alíquotas iguais durante toda a fase gástrica, totalizando 90 min a 130 rpm. Para o passo do duodeno, a acidez foi diminuída para pH 5 por adição de 1 mol.L^{-1} de NaHCO_3 . Então, no início desta etapa, $250 \text{ }\mu\text{L}$ de solução de sais biliares bovinos e pancreatina (2 g.L^{-1} de pancreatina e 12 g.L^{-1} de sais biliares bovinos em NaHCO_3 $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$) foram adicionados. Dentro deste passo, foi empregada uma agitação de 45 rpm durante 20 minutos. Finalmente, para o passo do íleo, o pH foi aumentado para 6,5 por adição de NaHCO_3 a 1 mol.L^{-1} e a agitação foi mantida a 45 rpm durante 90 min. Após cada etapa, o tubo correspondente a ela era completado com água destilada até 10 ml e congelado rapidamente para parar a reação enzimática.

Tabela 6 - Condições da simulação gastrointestinal.

Etapas	Condições simuladas	Agitação (rpm)	pH	Tempo (min)
Boca	A-amilase+ CaCl ₂	200	6,9	2
Esôfago- estômago	Pepsina+HCl	130	5,5	15
			4,6	15
			3,8	15
			2,8	15
			2	15
Duodeno	Pancreatina + sais biliáticos + NaHCO ₃	45	5	20
Íleo	NaHCO ₃	45	6,5	90

Para avaliar se os compostos de interesse, peptídeos e aminoácidos obtidos com a hidrólise, permaneceram disponíveis até a última fase da digestão foi avaliado seu teor de proteína pelos métodos de Lowry (1951) e Kjeldahl.

3.4.4 Atividade enzimática das proteases

Para garantir a atividade das enzimas aplicadas e saber com qual intensidade estas reagiriam com o substrato foi aplicado um teste de atividade enzimática nas 4 enzimas pesquisadas.

O extrato enzimático foi obtido da mesma forma que a descrita anteriormente. A hidrólise enzimática foi realizada com 1 mL do extrato enzimático e 2,5 mL do substrato albumina 0,5% (p.v⁻¹) em banho-maria a 35°C por 20 min. A reação foi interrompida com a adição de 5 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10% (p.v⁻¹). No tempo zero o TCA foi adicionado antes do extrato. Ao término da reação os aminoácidos produzidos foram determinados com 3 mL do extrato enzimático em 6 mL de NaOH 1 N e 1 mL do reagente Folin-Ciocalteu 2 N (diluído 1:2 com água) sendo a absorbância do complexo lida após 10 min em espectrofotômetro a 660 nm. A atividade enzimática específica do extrato foi definida como a quantidade (mg) de tirosina liberada (mg) por minuto por miligrama de proteína, sendo a curva de tirosina previamente construída entre as concentrações de 0 a 0,02 mg.mL⁻¹ (BADIALEFURLONG et al., 1994).

3.4.5 Espectrometria de massa

A análise MALDI-TOF-MS foi realizada utilizando um espectrômetro de massa MALDI autoflex III smartbean (Bruker Daltonics) equipado com o pacote de software FlexControl (versão 3.4, Bruker Daltonics). O método de aquisição espectral foi desenvolvido para maximizar o número de sinais presentes nos espectros de massa e as correspondentes relações sinal-ruído. Os espectros foram registrados no modo linear positivo (frequência do laser, 1000 Hz, tensão da fonte de íon 1, 25,19 kV, tensão da fonte de íons 2, 23,59 kV, tensão da lente, 7,50 kV, taxa de amostragem, 0,31, intervalo de massa, 5000-20000 Da). Para cada amostra, foram automaticamente adquiridos cinco espectros independentes (1000 disparos / espectro em posições aleatórias no mesmo local de destino), calibrados externamente usando o Padrão de Calibração de Proteína 1 (Bruker Daltonics) através do software FlexAnalysis (Bruker Daltonics) e posteriormente analisados.

3.4.6 Análise da estrutura da proteína antes e depois da aplicação do ultrassom

Para compreensão dos efeitos do ultrassom sobre a estrutura das proteínas do soro lácteo foram aplicadas duas técnicas: análise da estrutura terciária da proteína e tamanho de partícula.

Para a análise da estrutura terciária da proteína, utilizou-se espectrometria de fluorescência, logo após aplicação do ultrassom e sem o pré-tratamento (padrão).

Para análise de fluorescência, separou-se 1 mL das soluções de IPS tratadas e não tratadas com ultrassom (na concentração de 20 g/L). Essas amostras foram transportadas até o local da análise em seguida da aplicação do pré-tratamento, a fim de manter ao máximo o efeito do ultrassom. Os espectros de emissão de fluorescência foram registrados na faixa de 280 a 500 nm, com excitação em 210 nm (fendas de excitação e emissão de 20 nm e voltagem da fotomultiplicadora 800 V), parâmetros definidos através de tentativas consecutivas.

As análises de tamanho de partícula foram feitas em triplicata, pelo equipamento Multi-Angle Static Light-Scattering Mastersizer (Malvern Instruments, UK) disponibilizado pelo LFC-UFSC. O tamanho médio das gotas ou partículas foi caracterizado em termos de diâmetro médio de Sauter, $D_{3,2}$, obtido pela Equação 3 e 4 respectivamente (COSTA et al., 2008)

$$D_{3,2} = \frac{\sum_i n_i d_i^3}{\sum_i n_i d_i^2} \quad (3)$$

Sendo n_i é o número de gotas de diâmetro d_i .

Os dados de distribuição de tamanho podem ser usados para estimar a largura da distribuição, conforme a Equação 4.

$$Span = \frac{D_{90} - D_{10}}{D_{50}} \quad (4)$$

Sendo D_{10} , D_{50} e D_{90} os diâmetros máximos que correspondem a 10%, 50% e 90% do diâmetro total das partículas.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os efeitos das variáveis independentes investigadas sobre o GH do soro lácteo foram avaliados estatisticamente mediante análise do planejamento fatorial, utilizando software STATISTICA versão 10, e a ferramenta Estatística Experimental Design (DOE). Os resultados foram analisados estatisticamente pela análise de variância ao nível de 5% de significância. As médias e os desvios padrão foram analisados pelo software Excel (Microsoft, versão 2013).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ISOLADO PROTEICO DE SORO LÁCTEO

O IPS foi inicialmente analisado para determinar sua composição quanto ao teor de proteínas, lipídeos, cinzas e lactose. Obtiveram-se os resultados mostrados na Tabela 8, comparados àqueles especificados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e aos fornecidos pelo fabricante.

Tabela 7 – Comparação de resultados dos componentes do IPS.

Componente	MAPA (g%)	Fornecedor (g%)	Valores obtidos (g%)
Proteína	≥90,00	92,66	90,50
Lipídeos	≤1,50	0,50	0,60
Lactose	≤1,00	0,99	0,99
Cinzas	≤4,50	3,24	3,76

Observa-se na Tabela 8 que embora os resultados obtidos apresentem algumas diferenças quando comparados com os fornecidos pelo laudo do fabricante, principalmente no que se refere ao teor de proteína, todos os componentes atendem as exigências do MAPA para que seja considerado um isolado proteico de soro lácteo.

4.2 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A atividade enzimática em enzimas industriais é consideravelmente mais baixa do que em enzimas purificadas, pois essas enzimas apresentam em sua constituição impurezas, aditivos e estabilizantes sem função ativa, que se encontram na amostra, para estabilização, conservação ou devido à ausência de um processo de purificação.

A queratinase apresenta atividade de 600 kU/g segundo o fabricante, no teste realizado foi obtida uma atividade de $590 \pm 6,4$ kU/g, coincidente com o indicado pelo fabricante. Para a pepsina, a atividade enzimática obtida foi de $447 \pm 5,9$ kU/g. A papaína a savinase apresentaram atividade enzimática de foi $325 \pm 5,2$ kU/g e $298 \pm 5,8$ kU/g, repectivamente.

Os valores obtidos mostram a baixa pureza das enzimas utilizadas, quando comparadas a enzimas purificadas como, por exemplo, a lisozima da empresa Sigma-Aldrich que apresenta uma atividade de 109,05 kU/mg segundo o fabricante.

4.3 DEFINIÇÃO DAS ENZIMAS

Para verificar a atuação da enzima junto a solução aquosa de IPS foram realizados ensaios preliminares acompanhando a evolução do GH durante 24h. As condições aplicadas para cada enzima foram escolhidas através da literatura e são apresentadas na Tabela 3 (item 3.2.1).

A Tabela 9 mostra os valores de GH obtidos para as enzimas estudadas nesse trabalho.

Tabela 8 - Valores de GH obtidos para as diferentes enzimas estudadas.

Tempo(h)/ Enzimas	Queratinase (%)	Papaína (%)	Pepsina (%)	Savinase® (%)
T0	6,1±0,04 ^{aE}	6,0±0,03 ^{aE}	6,1±0,02 ^{aE}	6,2±0,02 ^{aE}
T6	10,2±0,04 ^{dD}	13,7±0,13 ^{bD}	15,3±0,06 ^{aDC}	12,5±0,05 ^{cD}
T12	12,6±0,12 ^{dC}	15,2±0,13 ^{bC}	16,0±0,11 ^{aCB}	14,6±0,04 ^{cC}
T18	15,4±0,09 ^{cB}	16,1±0,07 ^{bB}	16,4±0,03 ^{aB}	15,9±0,08 ^{bB}
T24	17,5±0,05 ^{bA}	17,2±0,08 ^{cA}	17,9±0,01 ^{aA}	17,0±0,04 ^{cA}

^{a,b,c} - Médias seguidas com a mesma letra na horizontal (linha) não diferem estatisticamente (5 % de significância). ^{A,B,C} - Médias seguidas com a mesma letra na vertical (coluna) não diferem estatisticamente (5 % de significância).

O maior valor de GH obtido foi com o uso da pepsina, atingindo 17,9% (24h), valor aproximadamente 3 vezes maior do que o valor inicial (6,1%), seguido pela queratinase (17,5%), papaína (17,2%) e Savinase® (17,0%). Até o tempo de 12 horas o maior valor de GH obtido foi também para a pepsina (16%).

As enzimas que apresentaram melhor comportamento e maior GH em tempos menores (de até 12 h) foram a papaína e a pepsina. Isso pode ser explicado pela maior afinidade dessas enzimas com o substrato, já que a queratinase tem como principal atuação a degradação de substratos compactos, como as queratinas, e funciona melhor na presença de agentes redutores, como o sulfito, ausentes na amostra em estudo (BON; FERRARA; CORVO, 2008). Já a Savinase® é uma mistura de proteases, sendo assim pouco específica, é mais utilizada em detergentes onde é necessário atacar proteínas variadas, como na limpeza industrial de roupas.

A papaína e a pepsina têm boa afinidade com as proteínas do leite, apresentaram maior GH em tempos de até 12 horas, o que pode representar um custo financeiro e de tempo de processo menor. A papaína não tem boa especificidade, mas exibe eficiência na hidrólise das proteínas do leite, atuando sobre substratos contendo resíduos de lisina, arginina ou valina (BEZERRA et al, 2013).

Queratinase, papaína e Savinase® apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre todos os tempos e quanto maior o período de reação melhor o resultado obtido. A pepsina não apresentou tal comportamento, o valor obtido no tempo de 12 horas mostrou-se estatisticamente igual ao de 6 horas, o mesmo ocorreu com o resultado de 12 horas quando comparado ao de 18 horas. O que demonstra uma maior velocidade de reação da pepsina, necessitando de menos tempo de hidrólise para alcançar graus de hidrólise semelhantes aos das outras enzimas estudadas.

Até o tempo de 12 horas todas as enzimas apresentavam diferença significativa entre si ($p < 0,05$), como o trabalho busca reduzir o tempo de processo optou-se por escolher as enzimas que apresentavam melhor resultado até esse tempo. Após 12 horas as enzimas papaína e Savinase® não apresentaram mais diferença significativa entre si ($p > 0,05$).

Com isso foram escolhidas a pepsina e a papaína para desenvolver as demais etapas deste estudo.

4.4 DEFINIÇÃO DAS CONDIÇÕES DE TRABALHO (pH E TEMPERATURA)

Como já comentado anteriormente, a pepsina possui uma condição ótima de hidrólise e fora desta pode levá-la à desnaturação. Assim, para a pepsina as condições de temperatura e pH foram definidas pela literatura em 37°C e pH 2,5 (ULUKO et al., 2015; MAT et al., 2017; PRICE et al., 2016)

Para a papaína desenvolveu-se um planejamento experimental onde se obtiveram-se os resultados apresentados na Tabela 10. Nesta tabela são mostrados os GH's em função do tempo, ou seja, assim que adicionada a enzima, após 5 h e 10 h de reação.

Tabela 9 - Valores de GH nos tempos 0, 5 e 10 h obtidos para soro lácteo utilizando-se a papaína.

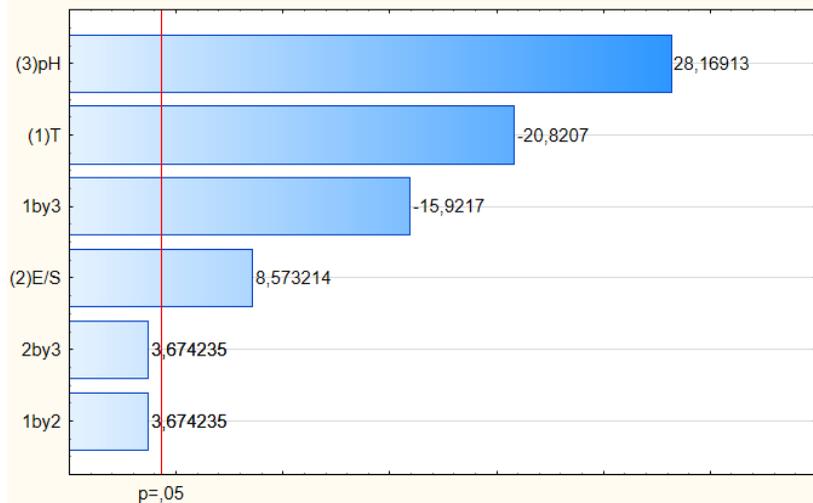
Ensaio	T (°C)	E/S (%)	pH	GH(t0)	GH(t5)	GH(t10)
1	50	1,5	5	7,33	10,17	10,17
2	70	1,5	5	7,12	8,14	8,14
3	50	3,5	5	6,92	8,95	9,16
4	70	3,5	5	6,51	10,17	10,17
5	50	1,5	7	7,12	12,21	12,21
6	70	1,5	7	7,33	10,17	10,17
7	50	3,5	7	7,12	14,24	14,24
8	70	3,5	7	6,10	10,17	12,62
9	60	2,5	6	6,10	12,01	12,21
10	60	2,5	6	6,31	11,80	12,21
11	60	2,5	6	6,10	12,01	12,21

De acordo com a Tabela 10 o maior GH obtido, em torno de 14%, utilizou maior quantidade de enzima, com pH em 7 e temperatura de 50 °C (ensaio 7). Já a condição que apresentou menor hidrólise (8,14%) do substrato, possuía condições opostas a essa, temperatura elevada de 70 °C, pH 5 e menor concentração de enzima na solução (ensaio 2). No tempo de 5 h foi possível observar que o GH do ensaio 7 foi de 40 % maior que o GH do ensaio 2.

O tempo de 5 h foi escolhido para a análise estatística do planejamento experimental, por ser um tempo em que a reação apresentou maiores alterações. Observou-se, de maneira geral, a influência da temperatura e do pH nos resultados obtidos. Ressalte-se que o modelo apresentou um fator de correlação (R) de 0,93. Os resultados do planejamento fatorial, com triplicata do ponto central, foram tratados estatisticamente com confiança de 95%.

Para facilitar a visualização do efeito das variáveis no GH obtido, foi construído um gráfico de Pareto (Figura 4), que mostra quais foram os fatores significativos.

Figura 3 - Gráfico de Pareto indicando os efeitos significativos dos parâmetros avaliados durante a hidrólise de IPS utilizando a papaína ($p=0,05$).



Através do gráfico de Pareto verificam-se que todas as variáveis estudadas apresentaram efeito significativo ($p < 0,05$) sobre o GH. O efeito estimado indica o quanto cada fator influenciou na resposta estudada, pois quanto maior o seu valor, maior é a sua influência. Dessa forma, observa-se que o resultado foi maior quando foram utilizados maiores valores de pH e menores temperaturas. Isso se confirma quando analisado de forma independente o ensaio 5 e 7 onde foram observados os maiores GHs. A relação enzima/substrato maior apresentou melhora nos resultados, isso se deve a maior disponibilidade de sítios ativos para interação com uma maior quantidade de substrato disponível, o que facilita a reação.

Homaei et al. (2010) analisou as melhores condições de pH e temperatura para a papaína e verificou que a forma livre da enzima mostra alta atividade em baixas temperaturas, até 60 °C, mas diminui significativa em temperaturas acima de 70 °C, sugerindo a alta sensibilidade da enzima ao calor, o que corrobora com os resultados do presente trabalho. Já o pH onde obtive maior atividade enzimática foi de

6,5 a 7, em valores diferentes desses ocorreu perda de atividade. Os resultados apresentados no estudo desses autores foram próximos aos encontrados no presente estudo.

Por essa análise estabeleceram-se as condições de trabalho com a papaína em 50 °C, pH 7 e uma relação enzima/ substrato elevada.

4.5 PROCESSO DE HIDRÓLISE

4.5.1 Pepsina

Com as condições de pH e temperatura escolhidas através da literatura para a pepsina, buscou-se aperfeiçoar a hidrólise, estudando-se diferentes concentrações de enzima e substrato, a fim de se atingir a hidrólise máxima possível. Os resultados obtidos para a pepsina estão apresentados na Tabela 10. A temperatura de 37 °C e pH de 2,5 foram mantidos constantes.

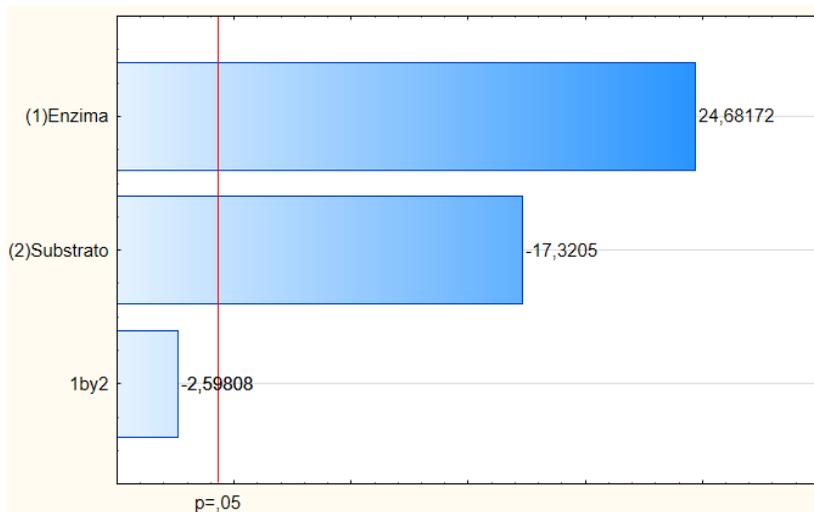
Tabela 10 – GH's obtidos para o IPS utilizando a pepsina em diferentes concentrações de enzima e substrato nos tempos 0, 5 e 10 h.

Ensaio	Enzima (g)	Substrato (g)	GH(t0)	GH(t5)	GH(t10)
1	0,05	4	6,6	15,3	15,3
2	0,05	12	8,5	11,9	11,9
3	0,5	4	7,6	18,3	21,6
4	0,5	12	8,5	11,9	17,0
5	0,275	8	7,6	14,0	16,5
6	0,275	8	7,6	14,6	16,9
7	0,275	8	7,7	14,4	16,5

De acordo com a Tabela 11, é possível observar que os maiores valores para o GH foram obtidos no tempo de 10 h de reação, obtendo-se um valor máximo de 21,6% quando se utilizou a concentração de substrato em seu nível inferior (4 g) e concentração de enzima em seu nível superior (0,5 g). Esse resultado é coerente uma vez que quando se tem concentração de substrato muito superior ao de enzima, não há sítios ativos suficientes para a hidrólise de todo o substrato. Este fato é corroborado pelo resultado do ensaio 2 onde havia menor concentração

de enzima disponível para a hidrólise do substrato gerando menor GH. Os resultados da Tabela 11 são corroborados pelo Gráfico de Pareto, apresentado na Figura 5, referentes ao tempo de hidrólise de 10 horas.

Figura 4 - Gráfico de Pareto para a pepsina mostrando os efeitos significativos



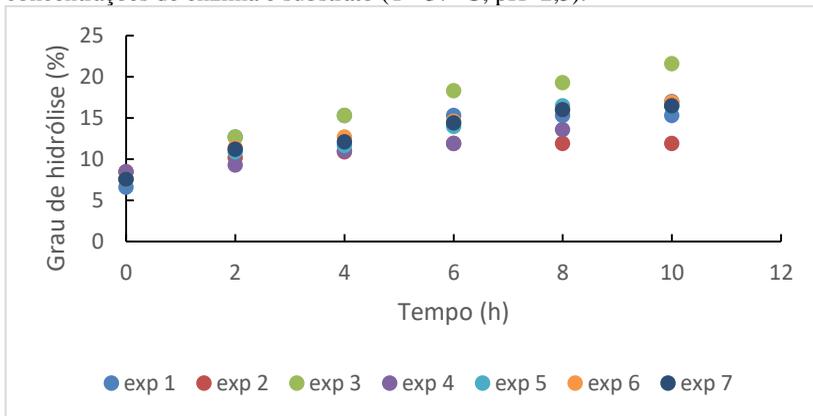
dos parâmetros avaliados durante a hidrólise de IPS ($p = 0,05$).

O gráfico de Pareto ($R^2=0,99$) da Figura 5, mostra que a enzima e o substrato influenciam de maneira significativa ($p<0,05$) no GH do IPS. Pode-se observar que para se obter o maior GH é deve-se utilizar uma menor quantidade de substrato e uma maior quantidade de enzima.

O ensaio 3 evidencia a importância das concentrações de enzima e substrato mostradas pelo Gráfico de Pareto, onde foi obtido o maior valor de GH quando se utilizou a concentração de enzima em seu nível inferior (0,5 g) em um substrato menos concentrado, com 4% de IPS. O ensaio 2, ao contrário, vem corroborar com essa tendência, quando se adiciona uma quantidade menor de enzima em uma solução mais concentrada, com 12% de substrato ocorre uma redução na capacidade hidrolítica.

Na Figura 6 observa-se a hidrólise do IPS, em função do tempo, utilizando-se a pepsina.

Figura 5 - GH do soro lácteo utilizando-se a pepsina em diferentes concentrações de enzima e substrato (T= 37 °C; pH=2,5).



Conforme a Figura 6, é possível observar a estabilização da reação a partir de 6 – 8 h em quase todos os experimentos, a velocidade inicial média dos ensaios foi de 1,5 %GH/h, sendo que após 6 h de hidrólise essa velocidade caiu para 0,8 %GH/h, comprovando a estabilização da hidrólise. Isto provavelmente ocorreu em razão da baixa concentração de enzima em relação à concentração de substrato, visto que no experimento 3, onde a concentração de substrato era menor, o GH aumentou após 6 h de processo. O comportamento apresentado na Figura 6 pode indicar uma diminuição na atividade dos sítios ativos das enzimas responsáveis pela hidrólise do substrato. Pela Figura 6 pode-se considerar que havendo maior disponibilidade de enzima no meio reacional poderia se obter maiores valores de GH.

Para confirmação um novo planejamento fatorial completo 2^2 foi realizado, com diminuição na concentração do substrato e aumentando-se a concentração de enzima. Definiram-se os novos valores conforme apresentados na Tabela 12.

Tabela 11 - Valores empregados para novos ensaios de melhoramento do GH com a pepsina, mantendo-se a temperatura de 37 °C e pH 2,5.

Parâmetros	Enzima (g)	Substrato (g)
-1	0,5	2
0	0,725	4
1	1	6

Com o emprego desses novos parâmetros e realização das análises, obtiveram-se os GH's apresentados na Tabela 13.

Tabela 12 - Valores de GH obtidos para a pepsina com o segundo planejamento experimental (Tabela 12).

Ensaio	Enzima	Substrato	GH(t0)	GH(t5)	GH(t10)
1	-1	-1	5,1	20,3	20,3
2	-1	1	8,5	12,2	13,6
3	1	-1	5,1	25,4	26,5
4	1	1	8,1	11,9	12,2
5	0	0	6,6	16	17,8
6	0	0	6,9	16,3	17,8
7	0	0	7,1	15,8	17,8

Com esses novos parâmetros o GH alcançou valores de 26,5%, utilizando 1 g. de enzima e 2 g. de substrato (ensaio 3). Comparando-se com o maior valor obtido anteriormente, de 21,6%, que utilizou 4g de substrato e 0,5g de enzima, obteve-se um aumento de 22,5%.

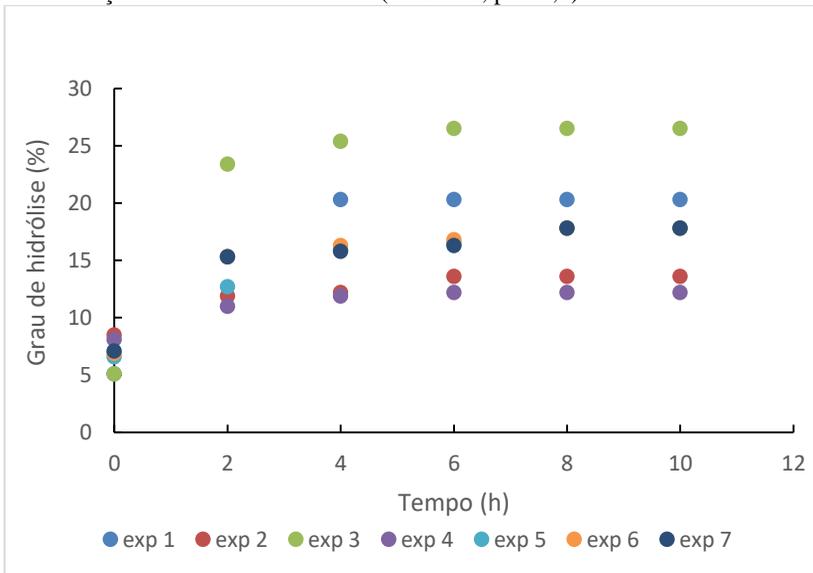
Portanto, pode-se observar um maior GH à medida que se diminuiu a concentração do substrato na solução, melhorando-se a ação da enzima, levando-se à um maior GH.

Quando se comparam os experimentos 3 e 4, que possuem a mesma concentração de enzima (1 g), mas com diferentes concentrações de substrato (experimento 3: 2 g e experimento 4: 6 g), observa-se um

aumento de mais de 200% na hidrólise das moléculas de proteínas. Ressalte-se que mesmo quando a concentração de enzima é reduzida, os melhores resultados se confirmam em amostras com menor concentração de substrato, como mostra o ensaio 1.

Para ilustrar, a Figura 7, mostra o aumento dos GH's em função do tempo, nos ensaios realizados.

Figura 6 – Gráfico de GH do soro lácteo utilizando a pepsina em diferentes concentrações de enzima e substrato (T= 37 °C; pH=2,5).



Pelo gráfico da Figura 7 fica evidente o aumento do GH nas primeiras duas horas de reação. O ensaio 3 apresenta velocidade inicial de 4,2 %GH/h, enquanto o ensaio 4, que apresentou menor GH teve velocidade inicial de 1,1 %GH/h., após 4 h de reação as velocidades ficaram em torno de 0,9 %GH/h. A amostra com maior variação de GH, o ensaio 3, aumentou em 459% em 2 horas. No entanto, entre 2 e 10 horas o aumento foi apenas 113%, mostrando a rápida atuação da enzima sobre substrato. Poulsen et al. (2016) observou uma tendência similar, um rápido aumento do GH nas primeiras 2 horas seguido de uma estabilização em torno de 8 horas, após o início da reação. Acredita-se que este fato pode ser em decorrência do agregamento das moléculas de proteína ou eventualmente com reações sofridas pelo IPS durante a fabricação, como a reação de Maillard.

4.5.2 Papaína

Para a papaína, fez-se o mesmo estudo, seguindo as condições definidas para a pepsina, com temperatura de 50 °C e pH 7. A Tabela 14 apresenta os dados obtidos.

Tabela 13 - Resultados da hidrólise com papaína para o primeiro planejamento experimental.

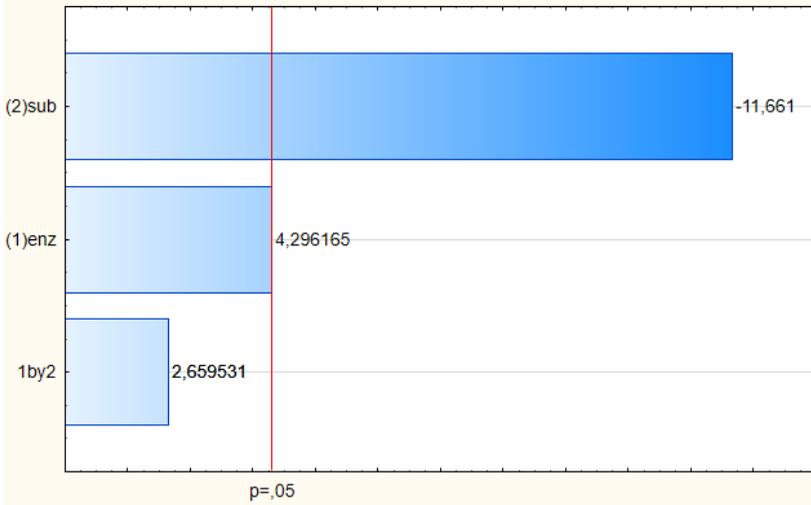
Ensaio	Enzima (g)	Substrato (g)	GH(t0)	GH(5)	GH(t10)
1	0,2	2	5,09	15,26	18,31
2	0,2	8	6,36	10,81	13,99
3	1	2	5,09	15,77	22,89
4	1	8	6,36	12,97	16,53
5	0,6	5	8,14	14,45	19,94
6	0,6	5	8,14	13,84	20,35
7	0,6	5	8,55	14,24	20,35

Os valores de GH obtidos com a aplicação da papaína atingiram 22,9% após 10 horas de reação, utilizando-se maior concentração de enzima e menor de substrato (ensaio 3). Ao contrário, com maior concentração de substrato e menor concentração de enzima, obteve-se apenas 14% (ensaio 2) de hidrólise, uma variação de 30%.

A papaína apresentou comportamento diferente da pepsina, não havendo estabilização do GH durante o tempo de processo. Em todos os experimentos a hidrólise evoluiu linearmente com o tempo, embora atingindo valores menores de GH do que os obtidos com a utilização da pepsina.

O Gráfico de Pareto mostra a importância da concentração de substrato na solução.

Figura 7 - Gráfico de Pareto para o primeiro planejamento experimental utilizando a papaína.

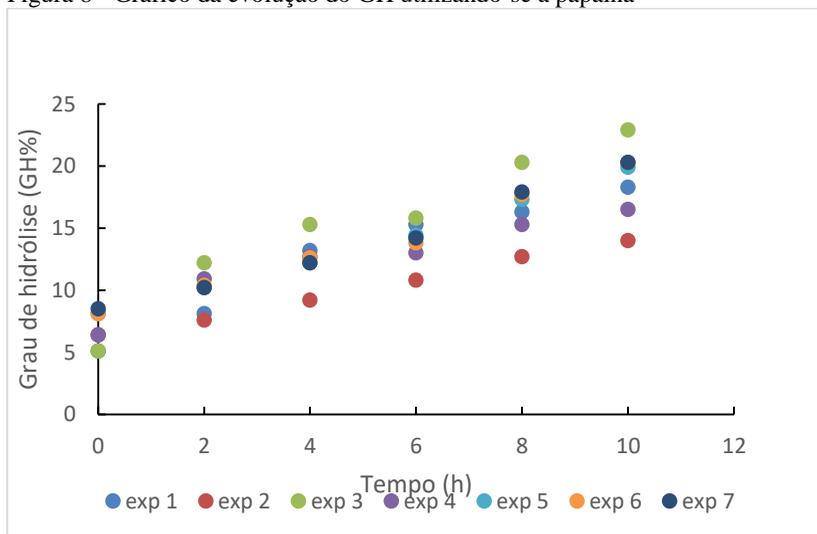


Pelo gráfico de Pareto da Figura 8 pode-se perceber a influência negativa da concentração de substrato na hidrólise, indicando que a menor concentração de substrato é o que leva à uma maior hidrólise. A quantidade de enzima não influenciou significativamente na hidrólise.

Portanto, verificou-se que para se obter um grau maior de hidrólise é necessário manter-se baixas concentrações de substrato, facilitando-se, assim, a atuação da enzima.

Na Figura 9 pode-se observar a evolução da hidrólise pela papaína em função de tempo. Verifica-se que houve um aumento gradual no GH, sem atingir a estabilização, pelo menos no tempo estudado.

Figura 8 - Gráfico da evolução do GH utilizando-se a papaína



O aumento constante do GH observado, pode ser explicado pela baixa especificidade da papaína. A velocidade inicial embora mais baixa do que na reação com a pepsina não apresenta estabilização, mantendo-se em torno de 0,8 %GH/h durante todo o tempo observado. Esta enzima não possui muita especificidade no ataque às ligações peptídicas, não apresentando uma grande hidrólise inicial como observado no estudo da pepsina, mas sim, um aumento constante na hidrólise em função do tempo de reação. O mesmo comportamento foi observado por Silva et al. (2010), que relata que o uso da papaína produziu um hidrolisado com peptídeos de maior massa molecular do que ao empregar uma enzima mais específica para o IPS, constatando a aleatoriedade de ataque dessa enzima.

4.6 APLICAÇÃO DO ULTRASSOM COMO PRÉ-TRATAMENTO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Como estratégia para melhorar a hidrólise, testou-se o uso de sonda ultrassônica anteriormente à adição das enzimas e após o pré-tratamento, seguiu-se o protocolo de hidrólise definido neste trabalho. Utilizou-se um planejamento fatorial completo 2^2 com 3 pontos centrais para cada enzima para avaliar a influência das condições de processo

utilizando-se o ultrassom. Os resultados são mostrados nos itens a seguir.

4.6.1 Pepsina

Na Tabela 15 estão apresentados os valores de GH, em função do tempo de hidrólise, para a pepsina utilizando-se diferentes condições operacionais durante a aplicação de ultrassom. As condições de hidrólise utilizadas para a pepsina foram: temperatura de 37°C, pH de 2,5, concentração de enzima de 1g/100ml e concentração de substrato de 2g/100ml.

Tabela 14 - Parâmetros utilizados e graus de hidrólise com a pepsina em diferentes condições de processo – potência e tempo de exposição ao ultrassom.

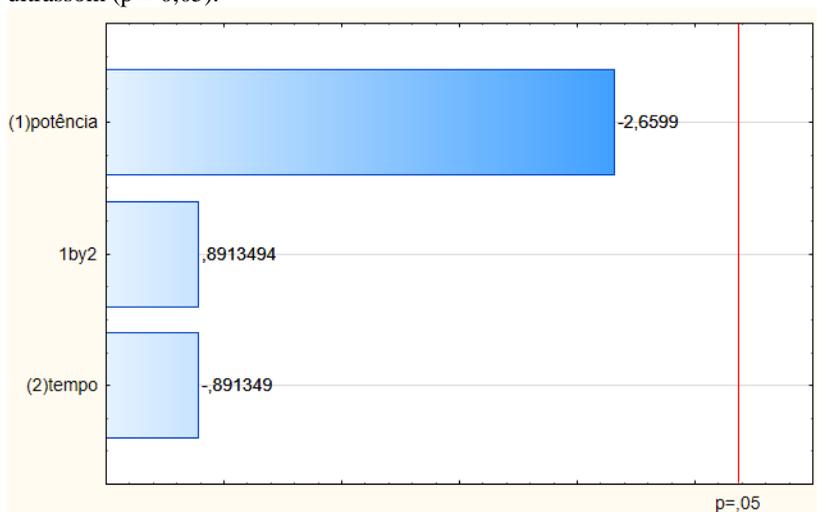
Ensaio	Potência (W)	Tempo (min)	GH(t0)	GH(t2)	GH(t4)	GH(t6)	GH(t8)	GH(t10)
1	300	2	5,14	23,4	25,4	26,5	26,5	26,5
2	300	6	5,14	23,3	25,4	26,5	26,5	26,5
3	500	2	5,16	23,5	25,5	26,4	26,5	26,5
4	500	6	5,16	23,4	25,4	26,5	26,5	26,5
5	400	4	5,16	23,4	25,4	26,5	26,5	26,5
6	400	4	5,25	23,5	25,6	26,5	26,6	26,6
7	400	4	5,25	23,6	25,6	26,5	26,5	26,6

Pode-se observar que os resultados obtidos se mantiveram muito próximos em todas as variações de tempo e potência aplicadas, resultados estes similares também aos encontrados sem a aplicação do pré-tratamento (padrão) para as mesmas condições de processo e enzima. Por isso, para a pepsina o uso de pré-tratamento nessas condições não favoreceu a hidrólise. Isso pode ter ocorrido devido à alta especificidade dessa enzima para o IPS ou a sua maior atividade enzimática quando comparada com a papaína, garantindo uma boa

interação e ativação dos sítios ativos da enzima mesmo com a diminuição do tamanho das partículas devido ao ultrassom, conforme evidenciado no item 4.7.3.

Para ilustrar o resultado, na Figura 10 está representado o gráfico de Pareto do planejamento experimental para o tempo de 6 horas, com R^2 de 0,875.

Figura 9 - Gráfico de Pareto mostrando os efeitos dos parâmetros avaliados durante a hidrólise de IPS utilizando-se a pepsina e o pré-tratamento com ultrassom ($p = 0,05$).



Como observado, nenhum dos parâmetros apresentou influência significativa sobre o GH. Destaca-se, portanto, a eficiência da pepsina, verificando-se que em 2 horas já ocorreu um grau significativo de hidrólise, indiferente do pré-tratamento utilizado. Acredita-se que isto possa ter ocorrido em razão da eficiência da enzima na hidrólise das moléculas de proteína, à despeito das fortes ligações em sua estrutura terciária.

4.6.2 Papaína

Variando-se a potência do ultrassom e o tempo de exposição da amostra, fez-se também para a papaína, um estudo da influência desses fatores no GH obtido na solução aquosa de IPS a 2%. A Tabela 16 apresenta os resultados obtidos. Após o uso do ultrassom nas condições estabelecidas na Tabela 15, foi realizada a hidrólise. As condições

utilizadas para a papaína foram: temperatura de 50°C, pH de 7, concentração de enzima de 1g/100ml e concentração de substrato de 2g/100ml.

Tabela 15 - Parâmetros utilizados e graus de hidrólise com a papaína em diferentes condições de processo – potência e tempo de exposição ao ultrassom.

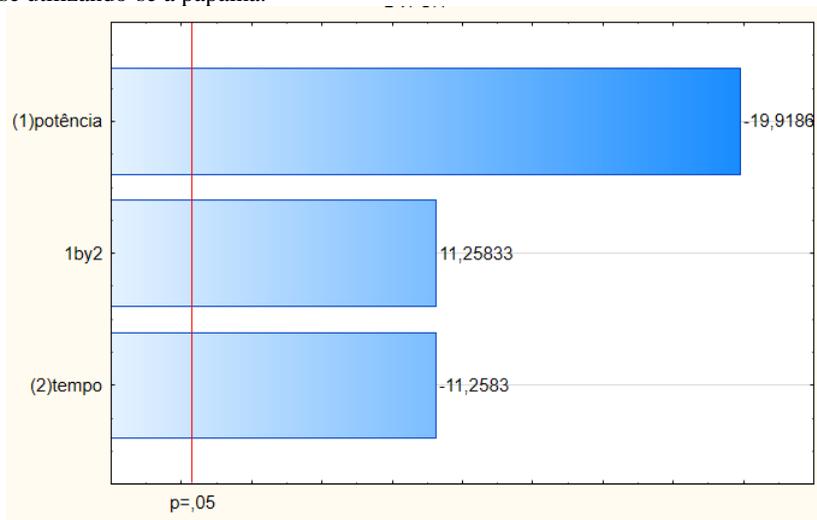
Ensaio	Potência (W)	Tempo (min)	GH (t0)	GH (t2)	GH (t4)	GH (t6)	GH (t8)	GH (t10)
1	300	2	5,1	20,3	21,4	21,9	22,4	23,5
2	300	6	5,1	16,3	18,5	19,3	20,4	20,4
3	500	2	5,2	17,3	18,3	18,3	18,3	18,3
4	500	6	5,2	16,3	18,3	18,3	18,3	18,3
5	400	4	5,2	19,3	20,3	20,4	20,8	21,4
6	400	4	5,2	19,5	20,2	20,6	20,9	21,4
7	400	4	5,2	19,3	20,3	20,6	21,0	21,4

A Tabela 16 mostra um melhor desempenho na hidrólise enzimática conforme reduziu-se o tempo de exposição e a potência do sonificador, sendo que a maior variação do grau de hidrólise ocorreu nas duas horas iniciais. Comparando-se o ensaio 1, onde se obteve maior GH, com o ensaio 3, com menor GH, têm-se uma diferença de 24,5%, considerando-se 2 horas de reação.

García et. al. (2016) estudaram a influência da potência do ultrassom como pré-tratamento de proteínas do soro lácteo hidrolizadas posteriormente com proteases vegetais e verificou esse mesmo comportamento. Os resultados indicaram que maiores densidades de ultrassom (0,220 W/mL) produziram rearranjos na estrutura proteica que resultavam na redução da taxa de hidrólise. Entretanto, em todos os ensaios o uso do ultrassom levou à um aumento na taxa de hidrólise.

A Figura 11 mostra como o tempo e a potência do ultrassom influenciaram na hidrólise enzimática, considerando-se 6 horas de processo.

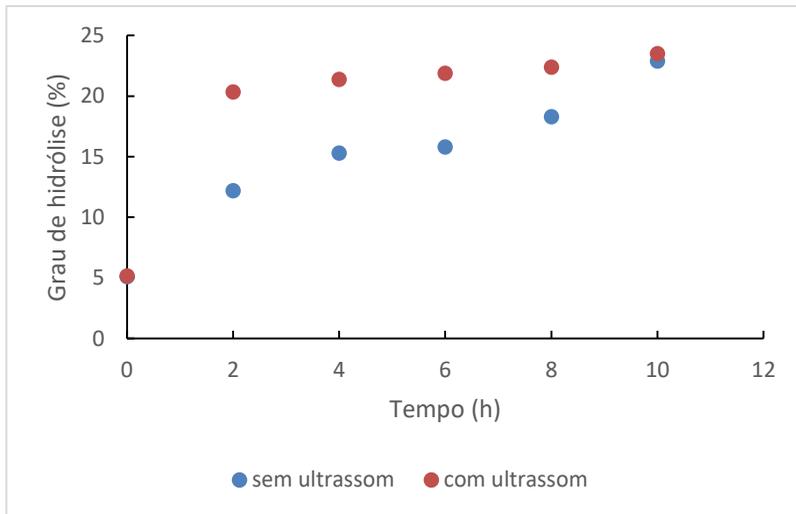
Figura 10 – Influência do tempo de exposição e potência do ultrassom na hidrólise utilizando-se a papaína.



O gráfico mostrado na Figura 11, evidencia uma maior influência da potência do ultrassom nos resultados. Entretanto, verifica-se que o tempo de exposição e a combinação dos dois fatores, tempo e potência, têm oposta influência nos resultados de hidrólise. Nos pontos centrais pode-se notar um GH maior do que nos ensaios 3 e 4. Utilizando-se uma potência menor, o maior tempo de exposição, combinado com uma potência média, levou à uma maior hidrólise.

Para melhor compreensão do efeito do ultrassom na velocidade da hidrólise, a Figura 12 mostra a evolução do GH de uma amostra com e sem pré-tratamento com ultrassom. Ambas as amostras que foram submetidas ao ultrassom apresentavam concentrações de 1 g de enzima/100ml de solução e 2 g de enzima/100ml de solução.

Figura 11 - Resultados do comparativo do ensaio 3, utilizando-se papaína com e sem pré-tratamento por ultrassom .



A Figura 12 mostra o efeito do ultrassom sobre o tempo de hidrólise. Nas primeiras duas horas de processo, após o pré-tratamento, verificou-se um incremento da hidrólise de 12 para 20%. A velocidade inicial também aumentou de 2 %GH/h no experimento sem o ultrassom para 3,6 %GH/h após o pré-tratamento. Com o tempo, ambas as amostras convergiram para um mesmo GH. Entretanto, com o pré-tratamento é possível reduzir, significativamente, o tempo de processo. Se comparado o GH no tempo de 2h na amostra pré-tratada, que foi de 20%, com o valor obtido após 10h de processo na amostra não pré-tratada, que foi de 23%, essa pequena diferença no valor de GH fica evidente. Entretanto, tem-se 8 h de diferença no tempo de hidrólise, o que torna o processo mais interessante economicamente e mais compatível com a realidade industrial.

4.7 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS E CARACTERIZAÇÃO DO HIDROLISADO

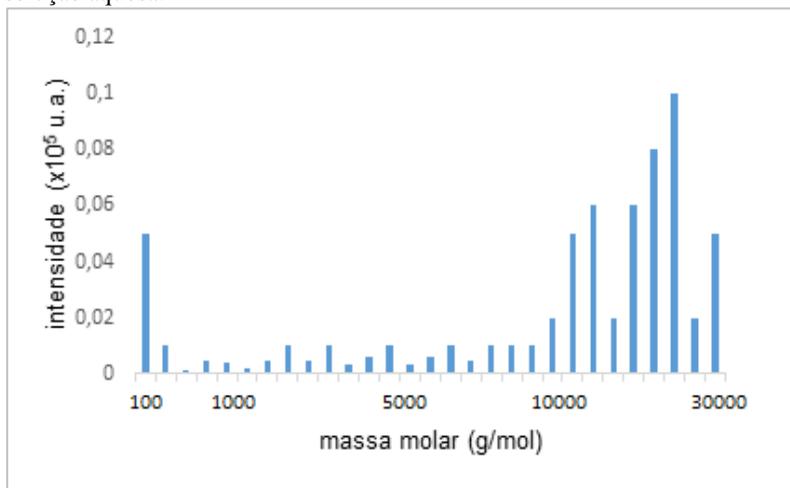
4.7.1 Espectrometria de massa

Para se verificar o grau de hidrólise das proteínas analisaram-se amostras submetidas e não submetidas ao pré-tratamento com ultrassom,

utilizando-se potência de 400 Watts, por 4 min, para cada uma das enzimas.

Para efeito comparativo, a Figura 13 mostra as massas molares do IPS antes da ser submetido à hidrólise.

Figura 12 – Perfil de distribuição de massas molares dos peptídeos do IPS em solução aquosa.



Observa-se na Figura 13 uma maior concentração de polipeptídios e/ou proteínas com massa molar superior a 10.000g/mol e uma quantidade considerável de aminoácidos, com massa molar em torno de 100 g/mol. Na faixa compreendida entre 10.000g/mol e 30.000 g/mol estão situadas as lactoglobulinas (com massa molar média de 25.000 g/mol) e as lactoalbuminas (massa molar média de 14.200g/mol).

4.7.1.1 Pepsina

Realizou-se um novo ensaio, utilizando-se as condições de processo que resultou em um maior GH - 1 g de enzima e 2 g de substrato em 100ml de solução. As amostras foram submetidas a hidrólise durante 6 horas ($T=37^{\circ}\text{C}$ e $\text{pH}=2,5$), sendo que uma delas foi submetida ao pré-tratamento com ultrassom, para se comparar as massas molares resultantes da hidrólise.

Figura 14 – Perfil de distribuição de massas molares dos peptídeos liberados após a hidrólise utilizando-se a pepsina sem pré-tratamento (pH 2,5, temp. 37 °C, 1% de pepsina e 2% de substrato) e tempo de hidrólise de 6h.

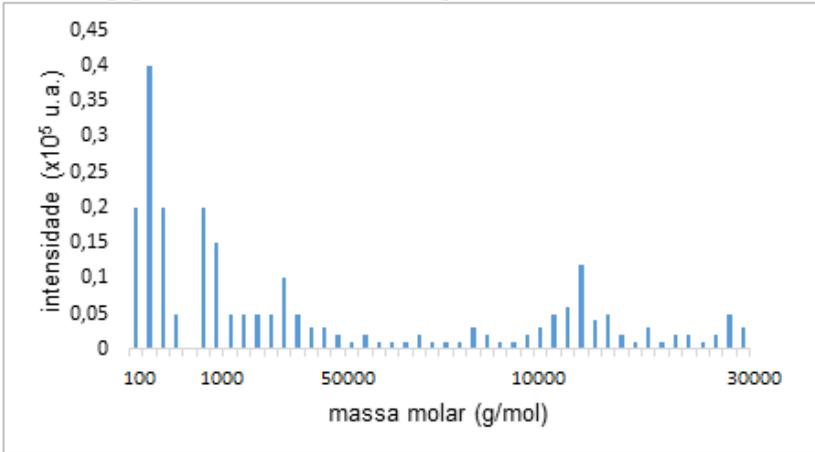
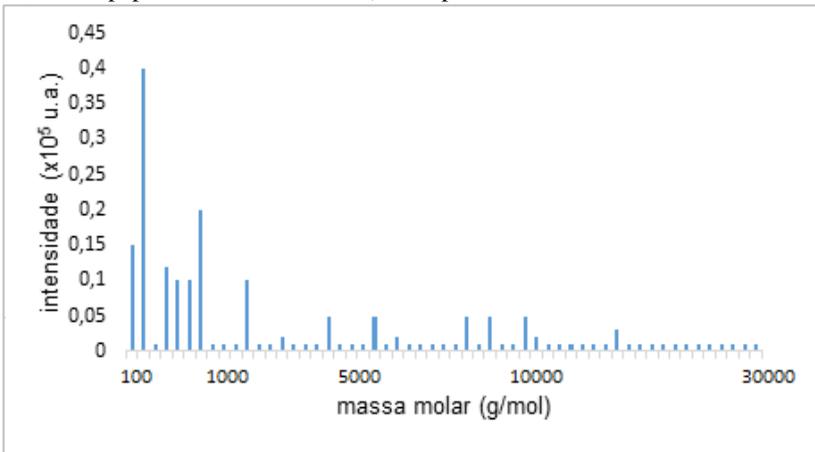


Figura 15 – Perfil de distribuição de massas molares dos peptídeos liberados após a hidrólise utilizando-se a pepsina com pré-tratamento (pH 2,5, temp. 37 °C, 1% de pepsina e 2% de substrato) e tempo de hidrólise de 6h.



A redução da concentração de peptídeos com massas molares superiores a 5000 g/mol é resultado da ação da enzima que libera peptídeos de menor massa molar, que são mais eficientemente absorvidos pelo organismo humano.

Pelos resultados mostrados nas Figuras 14 e 15, verificam-se picos semelhantes em ambas as amostras, mostrando que o ultrassom não afeta a forma como a enzima atua nas moléculas de proteína, apenas torna a hidrólise mais eficiente. Maiores investigações precisam ser feitas para entender melhor o processo.

4.7.1.2 Papaína

Também foi realizado ensaios com a papaína, utilizando-se as condições de processo que resultou em um maior GH - 1g de enzima e 2g de substrato em 100ml de solução. As amostras foram submetidas à hidrólise durante 6 horas, sendo uma pré-tratada e outra não pré-tratada om ultrassom. O perfil de distribuição dos peptídeos de ambas as amostras, são mostrados nas Figuras 16 e 17.

Figura 16 – Perfil de distribuição de massas molares dos peptídeos liberados após a hidrólise utilizando-se a papaína sem pré-tratamento (pH 7, temp. 50 °C, 1% de papaína e 2% de substrato) e tempo de hidrólise de 6h.

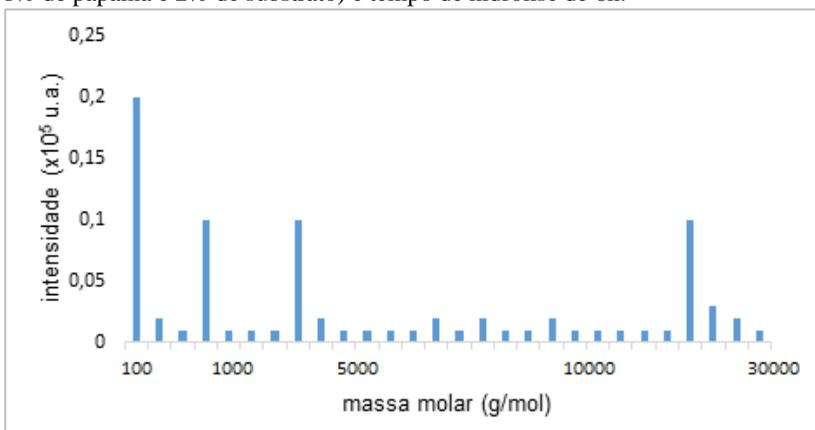
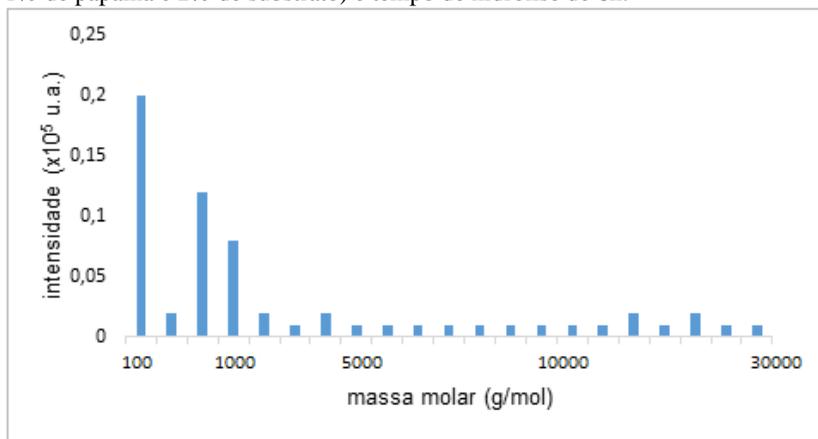


Figura 17 – Perfil de distribuição de massas molares dos peptídeos liberados após a hidrólise utilizando-se a papaína com pré-tratamento (pH 7, temp. 50 °C, 1% de papaína e 2% de substrato) e tempo de hidrólise de 6h.



Da mesma forma, a hidrólise ocorreu de forma semelhante em ambas as amostras, com ou sem pré-tratamento com ultrassom. Embora o tempo de hidrólise tenha sido menor, os espectros mostram que a hidrólise se manteve e em alguns intervalos de massa molar obteve-se maior intensidade de sinal espectrofotométrico, mostrando que o tempo de reação não afetou a formação dos produtos. Picos com massas maiores, entre 1000 e 3000 g/mol aparecem com maior frequência, o que indica uma quebra mais homogênea entre as moléculas de proteínas, ao mesmo tempo em que se têm uma redução na frequência de picos acima de 1000 g/mol.

A Tabela 17 mostra as massas molares obtidas para cada amostra hidrolisada e para o IPS em solução aquosa.

Tabela 17: listas de massas molares das amostras hidrolisadas e do IPS solubilizado.

Pepsina sem ultrassom	Pepsina com ultrassom	Papaína sem ultrassom	Papaína com ultrassom	IPS
159,355	159,365	159,362	159,36	159,366
237,132	237,134	170,309	255,059	326,442
256,113	256,115	255,179	360,412	360,415
445,048	360,412	360,413	718,435	691,007
648,103	445,054	718,442	732,879	708,567
656,056	656,061	758,543	758,555	732,885
692,492	674,587	760,908	780,606	758,565
780,549	714,388	780,93	788,952	780,818
804,555	780,576	788,942	2096,983	794,744
879,527	804,561	796,546	2818,711	796,522
915,579	879,549	820,504	2877,566	820,519
961,054	915,792	915,809	3031,308	1538,909
983,359	937,924	932,206	3188,371	1562,886
1005,75	960,978	1138,267	3418,099	6746,36
1059,581	983,358	1537,802	3629,518	6856,928
1119,665	1005,726	1563,531	4514,625	7079,606
1206,975	1017,62	1790,186	4613,835	9170,018
1322,669	1059,62	1905,478	7776,529	14116,56
1340,739	1119,516	2818,795	14115,698	14317,82
1342,741	1322,69	2878,905	15898,227	14434,93
1451,049	1450,939	3390,914	18374,053	15910,73
1473,641	1511,625	3418,379		18120,21
1511,54	1576,695	3630,052		18203,95
1576,499	1732,008	7802,962		18493,28
1732,213	1799,922	14115,616		21331,54
1799,877	2161,152	15910,602		25949,64
2139,25	2239,55	18390,601		29454,18
2161,137	2412,252	29515,674		34020,28
2204,359	2447,539			38742,38
2239,204	2469,844			

Continua.

Continuação Tabela 17

Pepsina sem ultrassom	Pepsina com ultrassom	Papaína sem ultrassom	Papaína com ultrassom	IPS
2386,254	3156,687			
2412,235	3929,207			
2468,809	3945,363			
3967,055	4092,018			
4091,756	4165,074			
4795,826	4796,531			
4940,87	4943,026			
6318,349	6465,034			
18412,557	18383,85			
21929,75	22000,26			
38540,906	38747,46			

Comparando as massas molares observadas com as massas conhecidas de alguns aminoácidos, pode-se observar semelhanças, como por exemplo o pico de massa 159 g/mol que provavelmente corresponde a arginina, que apresenta massa molar de 157 g/mol.

Os perfis peptídicos de todas as amostras dos ensaios estão apresentados no apêndice.

4.7.2 Biodisponibilidade

As amostras de IPS, antes e após hidrólise enzimática, foram submetidas a condições gastrointestinais simuladas *in vitro* para investigar as variações durante a passagem da boca até o intestino delgado, de forma a avaliar como as proteínas hidrolisadas estariam disponíveis para absorção. Após cada etapa, as amostras que foram submetidas às condições simulando o trato digestivo, referente a cada etapa analisada, eram congeladas, para posterior análise da concentração de proteínas bem como o perfil de peptídeos baseados em sua massa molar.

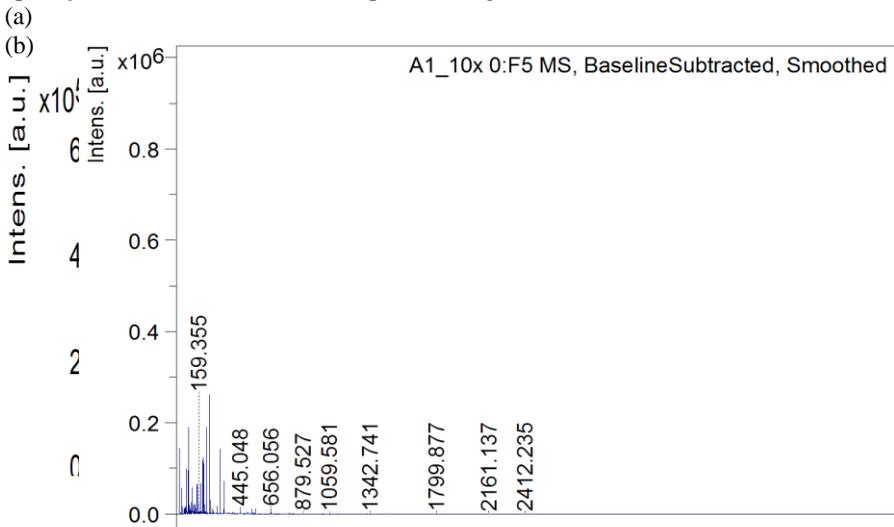
As amostras com concentrações iniciais de substrato de 8%, com 7,2% de proteínas, foram diluídas 10 vezes. Nesse processo, algumas enzimas foram adicionadas, aumentando, portanto, a concentração de proteína total até 0,80%. As amostras iniciais apresentaram massa de proteína de $0,712 \pm 0,009$ g e ao final, $0,798 \pm 0,007$ g.

Por este resultado, pode-se verificar que as proteínas do hidrolisado podem atingir o íleo, devido às condições semelhantes ao trato digestivo à que foram submetidas, onde poderão parcial ou integralmente serem absorvidas.

Avaliou-se, também, o perfil peptídico das amostras antes e após passarem pelo trato gastrointestinal simulado. Os resultados foram similares. Em todas observou-se aumento na quantidade de massas molares detectadas abaixo de 5000 g/mol através das intensidades dos sinais, que antes da digestão simulada situavam-se em 2×10^5 e, após eram superiores a 5×10^5 . Além disso, observa-se maior concentração de picos na região abaixo de 500 g/mol, o que indica maior quantidade de peptídeos nas amostras após a simulação gastrointestinal. Verificou-se, também, um aumento na intensidade e na quantidade de peptídeos de baixa massa molar próximas a di e tripeptídeos, como 198,7; 205,4; 273,8; 356,9 e 370,9 g/mol. A disponibilidade de agrupamentos de 2 ou 3 peptídeos têm efeitos benéficos ao organismo humano, tendo efeitos sobre doenças cardiovasculares e inflamações, contribuindo para a manutenção da saúde humana (UDENIGWE; ALUKO, 2012).

Para ilustrar esse comportamento, a Figura 18 apresenta o perfil peptídico de uma das amostras analisadas.

Figura 18 - Amostra hidrolisada por 6 horas de IPS a 8% e pepsina a 1% sem aplicação de ultrassom, antes (a) e após (b) a digestão.



4.7.3 Análise da estrutura da proteína após o ultrassom

Para se ter uma informação, pelo menos primária, se houve algum tipo de alteração na estrutura das proteínas, após serem submetidas ao ultrassom, realizaram-se análises de suas estruturas.

Quando ocorre a medição da fluorescência em amostras de alimentos, compostos químicos presentes naturalmente em sua matriz produzem fluorescência. Em derivados lácteos algumas das substâncias que contribuem para isso são os aminoácidos aromáticos, vitamina A, coenzimas, entre outros. Cada molécula tem seu espectro de excitação e emissão definidos, o que permite identificá-las (ANDERSEN; MORTENSEN, 2008).

Duas soluções, contendo apenas IPS a 2% solubilizado em água destilada, uma pré-tratada e outra não pré-tratada com ultrassom, foram submetidas a espectroscopia de fluorescência e os gráficos obtidos são apresentados nas Figuras 19 e 20.

Figura 19 - Espectro de fluorescência das amostras de IPS sem aplicação do ultrassom.

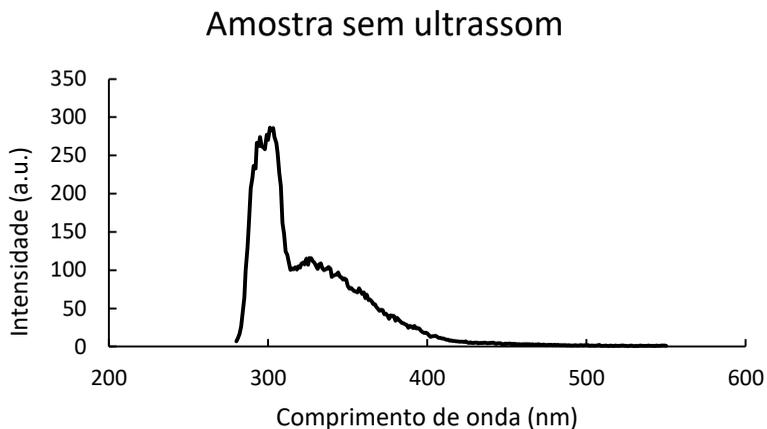
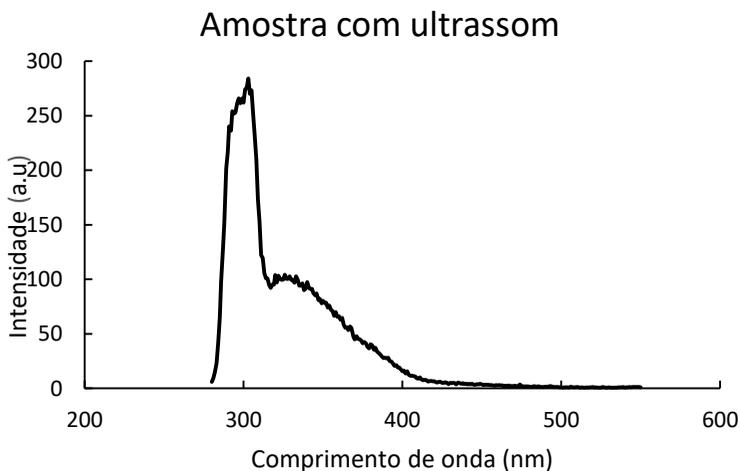


Figura 20 - Espectro de fluorescência amostras com aplicação do ultrassom.

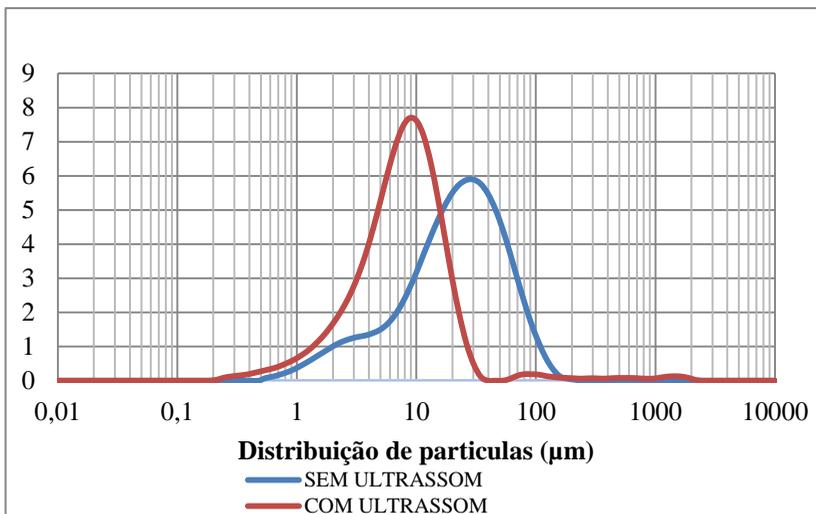


Em ambas as amostras, Figuras 19 e 20, é evidenciado um pico no comprimento de onda de 300 nm com intensidade de 280 a.u., indicando que o sonicador ultrassônico não afeta a estrutura terciária das proteínas.

Embora a faixa espectral de emissão usada seja conhecida na literatura por atribuição a diferentes aminoácidos (CHRISTENSEN et al.,2006), o pico obtido está mais próximo dos valores atribuídos a tirosina (302 nm com excitação em 276 nm) do que ao triptofano (357 nm com excitação em 280 nm), mostrando a influência da tirosina na fluorescência obtida.

Como não foi verificada alteração na estrutura terciária das proteínas do soro lácteo, fez-se o estudo do tamanho de partículas no meio reacional. A Figura 21 mostra os resultados obtidos para a amostra sem pré-tratamento e pré-tratada com ultrassom.

Figura 21 – Perfil de distribuição de tamanho médio de partículas das amostras de IPS com e sem pré-tratamento por ultrassom.



Pela Figura 21 é possível observar a diferença entre o tamanho médio das partículas de cada amostra. A amostra que não foi submetida ao pré-tratamento apresentou diâmetro médio de partículas de 20,7 µm, enquanto a amostra pré-tratada teve seu tamanho médio reduzido para 7,2 µm, uma redução de tamanho de partícula em torno de 3 vezes. Os valores de spam (distribuição dos tamanhos de partícula) passaram de 2,7 para 2,0 após a aplicação do ultrassom, mostrando assim uma melhora na homogeneidade dos tamanhos de partícula da solução.

As propriedades físicas e estruturais das proteínas podem mudar por ação mecânica. As vibrações do sonicador ultrassônico podem causar essas alterações (Bryant and McClements, 1998). Jambak et al. (2014), trabalhando com soro lácteo, verificaram que o ultrassom causou uma diminuição do tamanho das partículas, reduziu sua distribuição e aumentou a superfície livre específica. As alterações estruturais induzidas em proteínas pelo ultrassom estão associadas à clivagem parcial das interações hidrofóbicas intermoleculares, em vez de ligações peptídicas e dissulfeto. Quando partículas são submetidas ao cisalhamento, aumentam as colisões, reduzindo, frequentemente, o tamanho das partículas. A sonicação não tem efeito sobre a carga superficial, mas aumenta a superfície livre no material. O ultrassom de alta intensidade aplicado causa fricção e turbulência, porque gera uma pressão negativa levando a implosão de bolhas e cavitação.

YanJun et al. (2014) também verificaram a diminuição do tamanho das partículas em solução de concentrado proteico de soro lácteo após serem submetidas a sonda ultrassônica. Com isso obtiveram-se melhoras nas propriedades funcionais do IPS, como solubilidade e emulsão. Atribuiu-se essas melhoras à mudança na estrutura tridimensional das proteínas, aumentando a interação proteína-água pelo aumento das forças eletrostáticas.

3 CONCLUSÃO

Neste trabalho, o estudo da hidrólise enzimática do IPS utilizando-se as enzimas pepsina e papaína em diferentes concentrações, e variando-se a concentração do substrato e o uso de pré-tratamento, teve como objetivo principal melhorar o grau de hidrólise do IPS. Foi utilizado um planejamento experimental para melhor avaliar o efeito das condições aplicadas. Diferentemente dos outros parâmetros avaliados, a concentração de substrato influenciou o GH final para todas as condições de processo.

Maior grau de hidrólise das proteínas do IPS foi obtido com a papaína a 1% em relação à solução de IPS à 2%, 55°C e pH 7, quando submetida a um pré-tratamento com o ultrassom. Nesta condição, obteve-se 23% de hidrólise em duas horas de processo, enquanto sem pré-tratamento este tempo foi de 10 horas. Para a pepsina, o melhor grau de hidrólise foi obtido à 1% em relação à solução de IPS à 2%, 37°C e pH 2,5, onde se alcançou um grau de hidrólise de 26,5% em 6 horas de processo. O uso do pré-tratamento com ultrassom não alterou o grau de hidrólise para esta enzima.

O teste de biodisponibilidade mostrou que até o ponto de absorção pelo organismo (íleo) estão disponíveis uma considerável quantidade de di e tripeptídeos, produtos desejados na hidrólise de proteínas para obtenção de suplemento alimentar.

A análise de alteração conformacional do IPS mostrou que as estruturas terciárias das moléculas de proteínas, de uma maneira geral, não foram afetadas pelo pré-tratamento com ultrassom. O efeito positivo na atuação da papaína pelo ultrassom ocorreu possivelmente devido a diminuição do tamanho médio das partículas e homogeneização destas, conforme mostrado por difração a laser. Provavelmente, pelo melhor desempenho da pepsina, essa alteração de tamanho não teve efeito significativo na taxa de hidrólise.

Devido a carência de estudos na literatura sobre o emprego de enzimas comerciais para obtenção de hidrolisados proteicos, acredita-se que este trabalho contribui para o desenvolvimento de novas aplicações e processos com essas enzimas, diminuindo os custos de produção.

4 BIBLIOGRAFIA

ABIC – Associação Brasileira das Indústrias de Queijo, 2016. Disponível em: <http://www.abiq.com.br/>, acesso em 17/12/2017.

ALMEIDA, Cristine Couto de; CONTE, Carlos Adam Júnior; SILVA, Adriana Cristina de Oliveira; ALVARES, Thiago Silveira. **Proteína do soro do leite: composição e suas propriedades funcionais**. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.9, N.16; p.1840. 2013.

ALVES, R. L. D. **Projeto da Rede de Captação Logística do Soro de Queijo Produzido no Estado de Minas Gerais**. Minas Gerais: Departamento de Engenharia Elétrica. Universidade Federal de Viçosa, 2005. 33 p. Trabalho de Conclusão de Curso.

AMBROSI, V.; POLENTA, G.; GONZALEZ, C.; FERRARI, G.; MARESCA, P. **High hydrostatic pressure assisted enzymatic hydrolysis of whey proteins**. Innovative Food Science & Emerging Technologies. Volume 38, Part B, December 2016, Pages 294-301. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.05.009>.

ANDERSEN, C.M.; MORTENSEN, G. **Fluorescence Spectroscopy: A Rapid Tool for Analyzing Dairy Products**. J. Agric. Food Chem., v.56, n.3, 2008.

ANDRADE, A. C. De. **Estudo da Fermentação Simultânea à Hidrólise de Soro de Queijo, Utilizando Lactase e Saccharomyces cerevisiae.** Minas Gerais: Universidade Federal de Uberlândia, 2005. 110 p. Dissertação (Mestrado).

BADIALE-FURLONG, E.; RUIZ, W. A.; MARITINS, E. L. **Obtenção de amaciante de carnes a partir de resíduos da industrialização do abacaxi.** Revista Vetor. v. 4, n. 1, p. 33-41, 1994.

BALDASSO, C. **Concentração, Purificação e Fracionamento das Proteínas do Soro Lácteo através da Tecnologia de Separação por Membranas.** Porto Alegre: Escola de Engenharia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008. 179 p. Dissertação (Mestrado).

BETZEL, C.; KLUPSCH, S.; PAPENDORF, G.; HASTRUP, S.; BRANNER, S.; WILSON, K. S. **Crystal structure of the alkaline proteinase Savinase from Bacillus lentus at 1.4 Å resolution.** Journal of Molecular Biology. 223(2) 427±445. 1992.

BEZERRA, Vilma Sobral; CAMPOS, Julia Furtado; SILVA, Roberto Afonso da; PORTO, Tatiana Souza; LIMA, José Luiz de filho; PORTO, Ana Lúcia Figueiredo. **Biotechnological richness of the northeastern semi-arid region: antioxidant activity of casein hydrolysates from Moxotó goat milk (*Capra hircus Linnaeus, 1758*) obtained by papain action.** Food Sci. Technol, Campinas, 33(3): 513-520, July-Sept. 2013. Doi <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612013005000074>.

BIASUTTI, Eliza Augusta Rolim. **Otimização das condições da hidrólise enzimática das proteínas do soro de leite para obter elevado teor de oligopeptídeos: utilização da subtilisina e da pancreatina.** Dissertação de mestrado. Faculdade de Farmácia da UFMG. Belo Horizonte, MG. 2006

BON, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado.** Rio de Janeiro, 1ed. Interciência, 2008. P.290-300.

BRANDELLI, A. **Bacterial keratinases: useful enzymes for bioprocessing agroindustrial wastes and beyond.** Food Bioprocessing Technology. v1, pg105–116. 2008.

BRANDELLI, A., DAROIT, D.J. & RIFFEL, A. **Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications.** Microbiology Biotechnology. 2010. 85: 1735. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2398-5>.

BRASIL, Rafaella Belchior. **Estrutura e estabilidade das micelas de caseína do leite bovino.** Goiânia, 2003. Seminário apresentado junto à Disciplina de Seminários aplicados do Programa de

Pós-graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás. Doutorado.

BRYANT, C., McClements, D., 1998. **Molecular basis of protein functionality with special consideration of cold-set gels derived from heat denatured whey.** Trends in Food Science Technology 9, 143–151.

CARVALHO F, PRAZERES AR, RIVAS J. **Cheese whey wastewater: characterization and treatment.** Sci Total Environ. 2013;445–446:385–96. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.12.038>.

CHIBUIKE, C.; UDENIGWE; ALUKO, ROTIMI E. **Food Protein-Derived Bioactive Peptides: Production, Processing, and Potential Health Benefits.** Vol. 71, Nr. 1, 2012. Journal of Food Science. doi: 10.1111/j.1750-3841.2011.02455.x.

CHRISTENSEM, J.; NOERGAARD, L.; BRO, R.; ENGELSEN, S.B. **Multivariate Autofluorescence of Intact Food System.** Chemical Reviews, v.106, n.6, p. 1979-1994, 2006.

CLEMENTE, A. **Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition.** Trends in Food Science & Technology, v.11, n.7, p.254-262. 2000. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(01\)00007-3](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(01)00007-3).

CONAB (Conselho nacional de abastecimento). Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_05_04_17_33_34_leite_abril_2016.pdf>. Acesso em 6 de novembro de 2017.

COSTA, F. F.; RESENDE. J. V.; ABREU, L. R.; GOFF, H. D. **Effect of calcium chloride addition on ice cream structure and quality.** Journal of Dairy Science, Champaign, v.91, n.6, p.2165-2174, June 2008.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). Agência de informação - Agronegócio do leite. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/agencia8/AG01/arvore/AG01_12_8_21720039243.html>. Acesso em 20 de novembro de 2017.

FLORES, P. **Desarrollo de bioprocesos para la reducción de los niveles de DBO y DQO de efluentes de la industria alimentaria.** Revista Peruana de Química e Ingeniería Química, [S.l.], v. 11, n. 1, p. 3-10, mar. 2014. ISSN 1609-7599. Disponível em: <<http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/quim/article/view/4842/3915>>. Acesso em 18 out. 2017

GAJO, Fabiula Ferrarez Silva; GAJO, Adriano Alvarenga; SILVA, Roberta Bessa Veloso; FERREIRA, Eric Batista. **Diagnóstico da destinação do soro de leite na mesorregião do campo das**

vertentes – minas gerais. Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, v. 71, n. 1, p. 26-37, jan/mar, 2016.

GARCÍA, Lucía Abadía; TOSTADO, Eduardo Castaño; OZIMEK, Lech; GÓMEZ, Sergio Romero; OZUNA, César; LLANO, Silvia L. Amaya. **Impact of ultrasound pretreatment on whey protein hydrolysis by vegetable proteases.** Innovative Food Science and Emerging Technologies. 2016. Vol 37 Part A, pg 84-90.

GUZMAN, Maria L.; MARQUES, Margareth R.; OLIVERA, Maria E.; STIPPLER, Erika. **Enzymatic activity in the presence of surfactants commonly used in dissolution media, Part 1: Pepsin.** Results in Pharma Sciences 6 (2016) 15–19.

HADDAR, A.; SELLAMI-KAMOUN, A.; FAKHFAKH-ZOUARI, N.; HMIDET, N.; NASRI, M. **Characterization of detergent stable and feather degrading serine proteases from Bacillus mojavensis A21.** Biochemical Engineering. Journal. v51, pg 53–63. 2010.

HARAGUCHI F.K.; ABREU W.C.; PAULA H. **Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana.** Revista Brasileira de Nutrição, 19(4):479-488, jul./ago., Campinas, 2006.

HOMAEI, Ahmad Abolpou; SAJEDI, Reza H; SARIRI, Reyhaneh; SEYFZADEH, Sara; STEVANATO, Roberto. **Amino Acids.** March 2010, Volume 38, Issue 3, pp 937–942. <https://doi.org/10.1007/s00726-009-0302-3>.

INMETRO (Instituto Nacional De Metrologia, Qualidade e Tecnologia). Relatório final sobre a análise em suplementos proteicos para atletas – whey protein. Acesso em 28 de dezembro de 2017. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/consumidor/produtos/Relatorio_Whey_Final.pdf

JAIN, S.; ANAL, A.K. **Optimization of extraction of functional protein hydrolysates from chicken egg shell membrane (ESM) by ultrasonic assisted extraction (UAE) and enzymatic hydrolysis.** LWT-Food Sci Technol 69:295–302. 2016. doi: 10.1016/j.lwt.2016.01.057.

JIN, J.; MA, H.; QU, WANG. K.; ZHOU, C.; HE, R.; LUO, L.; OWUSU, J. **Effects of multi-frequency power ultrasound on the enzymolysis of corn gluten meal: kinetics and thermodynamics study.** Ultrason Sonochem 27:46–53. 2015. doi:10.1016/j.ultsonch.2015.04.031

JOVANOVIĆ, Jelena R.; STEFANOVIĆ, Andrea B.; SEKULJICA, Natasa Z.; TANASKOVIĆ, Sonja M.; JAKOVETIĆ, Dojčinović, Marina B.; BUGARSKI, Branko M.; KNEZEVIĆ-JUGOVI, Zorica D. **Ultrasound Pretreatment as an Useful Tool to Enhance Egg White Protein Hydrolysis: Kinetics, Reaction Model, and Thermodynamics**. Journal of Food Science. Vol. 81, Nr. 11, 2016.

KINSELLA, J.E. & WHITEHEAD, D. M. **Proteins in whey: chemical, physical, and functional properties**. Adv. Food Nutr Res., v.33, p.343-437,1989.

KOTHARI D.; RANI A.; GOYAL A. **19 – Keratinases. Current Developments in Biotechnology and Bioengineering. Production, Isolation and Purification of Industrial Products**. 2017, Pages 447–469. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63662-1.00019-1>

LUCAS, Jesús Fernández; CASTAÑEDA Daniel; HORMIGO, Daniel. **New trends for a classical enzyme: Papain, a biotechnological success story in the food industry**. Trends in Food Science & Technology. Volume 68, October 2017, Pages 91-101.

LUZ, Gabriela, B. **E-Tech: Tecnologias para Competitividade Industrial**. ISSN 1983-1838, v. 9, n. 2, 2016. Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

MA, Xiaobin; WANG, Danli; YIN, Michelle; LUCENTE, Juliet; WANG, Wenjun; DING, Tian; YE, Xingqian; LIU, Donghong. **Characteristics of pectinase treated with ultrasound both during and after the immobilization process**. Ultrasonics Sonochemistry. Volume 36, May 2017, Pages 1-10. DOI: [10.1016/j.ultsonch.2016.10.026](https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.10.026).

MAT, Damien J.L.; CATTENOZ, Thomas; SOUCHON, Isabelle; MICHON, Camille; FEUNTEUN, Steven Le. **Monitoring protein hydrolysis by pepsin using pH-stat: *In vitro* gastric digestions in static and dynamic pH conditions**. Food Chemistry. Volume 239, 15 January 2017, Pgs 268-275. DOI: [10.1016/j.foodchem.2017.06.115](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.115).

MEDENDORP, Joseph; BRIC, John; CONNELLY, Greg; TOLTON, Kelly; WARMAN, Martin. **Development and beyond: Strategy for long-term maintenance of an online laser diffraction particle size method in a spray drying manufacturing process**. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. Vol. 112, 10 August 2015, Pg 79-84. DOI: [10.1016/j.jpba.2015.04.019](https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.04.019)

MOHORČIĆ, M.; TORKAR, A.; FRIEDRICH, J.; KRISTL, J., MURDAN, S. **An investigation into keratinolytic enzymes to**

enhance unguinal drug delivery. International Journal of Pharmacy. v332, pg196–201. 2007.

OTTE, Jeanette; SHALABY, Samah M.; ZAHORA, Mila; PRIPP, Are H.; EL-SHABRAWY, Sayed A. **Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of milk protein hydrolysates: Effect of substrate, enzyme and time of hydrolysis.** International Dairy Journal. V. 17, pg 488-503. 2007. DOI: 10.1016/j.idairyj.2006.05.011.

PACHECO, Bertoldo; DIAS, Maria Teresa; NÁDIA, F.G.; BALDINI, Vera Lúcia S.; TANIKAWA, C.; SGARBIERI, Valdemiro C. **Propriedades funcionais de hidrolisados obtidos a partir de concentrados proteicos de soro de leite.** Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=395940074026> Acesso em 25 de novembro de 2017.

PATEL, Seema. **Functional food relevance of whey protein: A review of recent findings and scopes ahead.** Journal of Functional Foods 19 (2015) 308–319.

PESSATO, Tássia Batista. **Hidrolisados de isolado proteico do soro de leite obtidos com alcalase livre e imobilizada: caracterização e detecção de proteínas alergênicas.** Campinas, 2014. Dissertação (Mestrado).

PHADUNGATH, C. **Casein micelle structure: a concise review.** Journal Science Technology, v. 27, p. 201-212, 2005.

PORTO, Lia de Mendonça; SANTOS Rinaldo Cardoso dos; MIRANDA, Tânia Lúcia Santos. **Determinação das melhores condições operacionais do processo de produção da ricota.** B. Ceppa, Curitiba, v. 23, n. 1, jan./jun. 2005.

POULSEN, Nina A.; ESKILDSEN, Carl E.; AKKERMAN, Marije; JOHANSEN, Lene B.; HANSEN, Mikka S.; HANSEN, Per W.; SKOV, Thomas; LARSEN, Lotte B. **Predicting hydrolysis of whey protein by mid-infrared spectroscopy.** International Dairy Journal. V61. 2016. pg44-50. DOI: 10.1016/j.idairyj.2016.04.002.

PRICE, Samuel J.; PANGLOLI, Philipus; KRISHNAN, Hari B.; DIA, Vermont P. **Kunitz trypsin inhibitor in addition to Bowman-Birk inhibitor influence stability of lunasin against pepsin-pancreatin hydrolysis.** Food Research International 90 (2016) 205–215. DOI: 10.1016/j.foodres.2016.10.051.

RAHAMAN, Toheder; VASILJEVIC, Todor; RAMCHANDRAN, Lata. **Effect of processing on conformational changes of food proteins related to allergenicity.** Trends in Food Science & Technology 49 (2016) 24e34. DOI: 10.1016/j.tifs.2016.01.001.

RAWLINGS, N.D.; WALLER, M.; BARRETT, A.J.; BATEMAN, A. **MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors**. *Nucleic Acids Research*. 2014. doi: 10.1093/nar/gkt953.

ROCHA, Gabriela Fernanda; KISE, Francisco; ROSSO, Adriana Mabel; PARISI, Mónica Graciela. **Potential antioxidant peptides produced from whey hydrolysis with an immobilized aspartic protease from *Salpichroa organifolia* fruits**. *Food Chemistry*. V237. 2017. pg350–355. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.05.112.

ROCHA, Gabriela Fernanda; KISE, Francisco; ROSSO, Adriana Mabel; PARISI, Mónica Graciela. **Potential antioxidant peptides produced from whey hydrolysis with an immobilized aspartic protease from *Salpichroa organifolia* fruits**. *Food Chemistry*. Volume 237, 15 December 2017, Pages 350-355. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.112>.

SHEN, Xue; FANG, Tianqi; GAO, Feng; GUO, Mingruo. **Effects of ultrasound treatment on physicochemical and emulsifying properties of whey proteins pre- and post-thermal aggregation**. *Food Hydrocolloids*. Volume 63, February 2017, Pages 668-676. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2016.10.003.

SILVA, M.R.; RODRIGUES, D. F.; SILVA, V. D. M.; MORAIS, H. A.; SILVESTRE, M. P. C. **Peptide profile enzymatic hydrolysates from whey protein concentrate obtained by action of pancreatin and papain**. *Nutrire: rev. Soc. Bras. Alim. Nutr.= J. Brazilian Soc. Food Nutr.*, São Paulo, SP, v.35, p.97-114, dez. 2010.

SPELLMAN, D.; McEVOY, E.; O'CUINN, G.; GERALD, R.J.Fitz. **Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis**. *International Dairy Journal*. Volume 13, Issue 6, 2003, Pages 447-453. DOI: 10.1016/S0958-6946(03)00053-0

STEFANOVÍČ, A.; JOVANOVIĆ, J.; DOJČINOVIĆ, M.; LEVIĆ, S.; ZUZA, M.; NEDOVIĆ, V.; KNEZEVIĆ-JUGOVIĆ, Z. **Impact of high-intensity ultrasound probe on the functionality of egg white proteins**. *JHED* 6:215–24. UDC 637.413.054. 2014.

TAMM F., DRUSCH S. **Impact of enzymatic hydrolysis on the interfacial rheology of whey protein/pectin interfacial layers at the oil/water-interface**. *Food Hydrocolloids*, 63 (2017), pp. 8-18. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.08.013>

TORRES, Duarte Paulo Martins. **Gelificação Térmica de Hidrolizados enzimáticos de Proteínas do Soro de Leite Bovino**.

COMPORTAMENTO DE SISTEMAS AQUOSOS MISTOS PÉPTIDOS-POLISSACARÍDEOS. Universidade do Minho. Braga. Dissertação mestrado. 2005.

ULUKO, H.; ZHANG, S.; LIU, L.; CHEN, J.; SUN, Y.; SU, Y.; LI, H.; CUI, W.; LV, J. **Effects of microwave and ultrasound pretreatments on enzymolysis of milk protein concentrate with different enzymes.** Int J Food Sci Technol 48:2250–57. 2015. doi: 10.1111/ijfs.12211.

VERRUCK, Silvani; CARVALHO, Mariana Wolf De; LIZ, Gabriela Rodrigues De; AMANTE, Edna Regina; VIEIRA, Cleide Rosana Werneck; AMBONI, Renata Dias De Mello Castanho; PRUDENCIO, Elane Schwinden. **Survival of Bifidobacterium BB-12 microencapsulated with full-fat goat's milk and prebiotics when exposed to simulated gastrointestinal conditions and thermal treatments.** Small Ruminant Research. 2017. Florianópolis, SC. Brasil.

WANG, B.; ATUNGULU, G.G.; KHIR, R.; GENG, J.; MA, H.; LI, Y.; WU, B. **Ultrasonic treatment effect on enzymolysis kinetics and activities of ace-inhibitory peptides from oat-isolated protein.** Food Biophys 10:244–52. 2014. doi: 10.1007/s11483-014-9375-y.

YANJUN, Sun; JIANHANG, Chen; SHUWEN, Zhang; HOGJUAN, Li; JING, Lu; LU, Liu; ULUKO, H.; YANLING, Su; WENMING, Cui; WUPENG, Ge; JIAPING, Lv. **Effect of power ultrasound pre-treatment on the physical and Functional properties of reconstituted milk protein concentrate.** Journal of Food Engineering, v.124, pg 11-18. 2014. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2013.09.013.

ZHOU, Cun-shan; HU, Jiali; YU, Xiaojie; EL GASIM, Abu A.; YAGOUB; ZHANG, Yanyan; MA, Haile; GAO, Xianli; OUT, Phyllis Naa Yarley. **Heat and/or ultrasound pretreatments motivated enzymolysis of corn gluten meal: Hydrolysis kinetics and protein structure.** LWT - Food Science and Technology, 2017, 77: 488-496. DOI: 10.1016/j.lwt.2016.06.048.

ZOU, Y.; DING, Y.; FENG, W.; WANG, W.; LI, Q.; CHEN, Y.; WU, H.; WANG, X.; YANG, L.; WU, X. **Enzymolysis kinetics, thermodynamics and model of porcine cerebral protein with single-frequency countercurrent and pulsed ultrasound-assisted processing.** Ultrason Sonochem 28:294–301. 2016. doi: 10.1016/j.ultsonch.2015.08.006.

Apêndice A - perfis de distribuição de massas molares dos peptídeos.

Figura A - Perfil de distribuição de massas molares dos peptídeos liberados após a hidrólise utilizando-se a pepsina sem pré-tratamento (pH 2,5, temp. 37 °C, 1% de pepsina e 2% de substrato) e tempo de hidrólise de 6h, de 0 a 3000

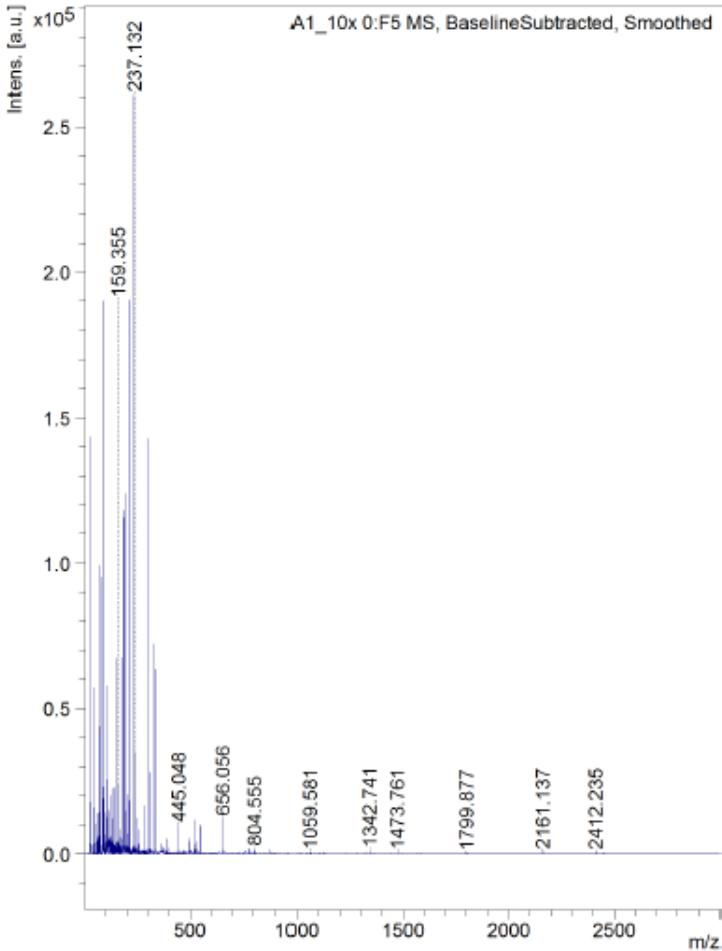


Figura B - Perfil de distribuição de massas molares dos peptídeos liberados após a hidrólise utilizando-se a pepsina sem pré-tratamento (pH 2,5, temp. 37 °C, 1% de pepsina e 2% de substrato) e tempo de hidrólise de 6h, de 0 a 5000 Da.

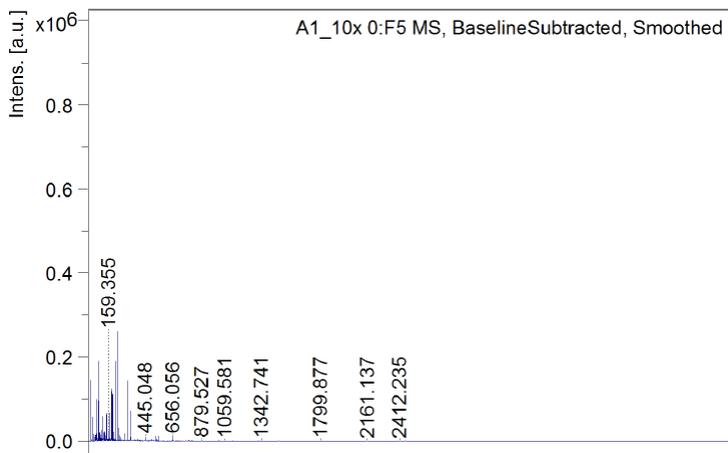


Figura C - Perfil de distribuição de massas molares dos peptídeos liberados após a hidrólise utilizando-se a pepsina sem pré-tratamento (pH 2,5, temp. 37 °C, 1% de pepsina e 2% de substrato) e tempo de hidrólise de 6h, de 0 a 10000 Da.

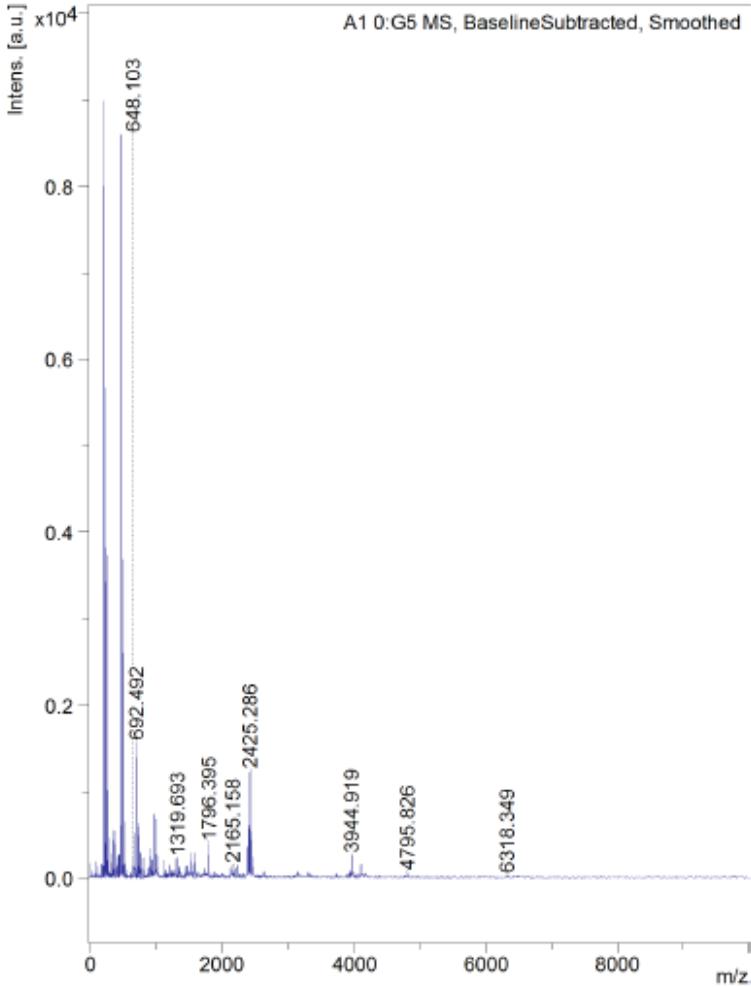


Figura D - Perfil de distribuição de massas molares dos peptídeos liberados após a hidrólise utilizando-se a pepsina sem pré-tratamento (pH 2,5, temp. 37 °C, 1% de pepsina e 2% de substrato) e tempo de hidrólise de 6h, de 0 a 20000 Da.

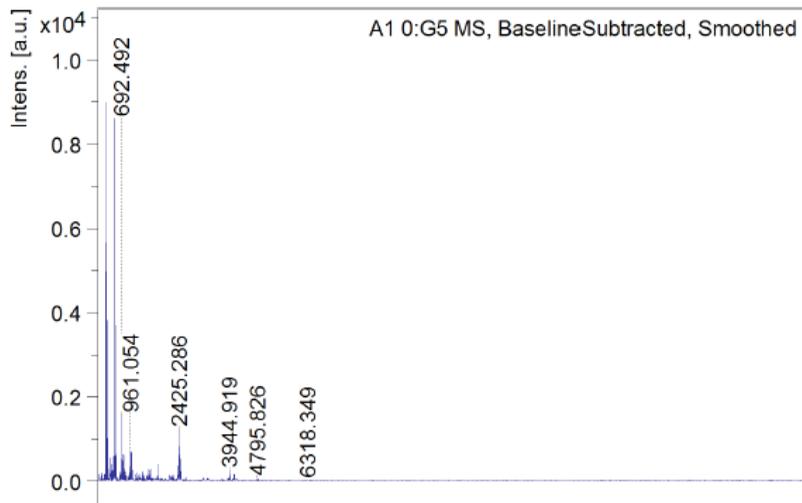


Figura E - Perfil de distribuição de massas molares dos peptídeos liberados após a hidrólise utilizando-se a pepsina com pré-tratamento (pH 2,5, temp. 37 °C, 1% de pepsina e 2% de substrato) e tempo de hidrólise de 6h, de 0 a 3000 Da.

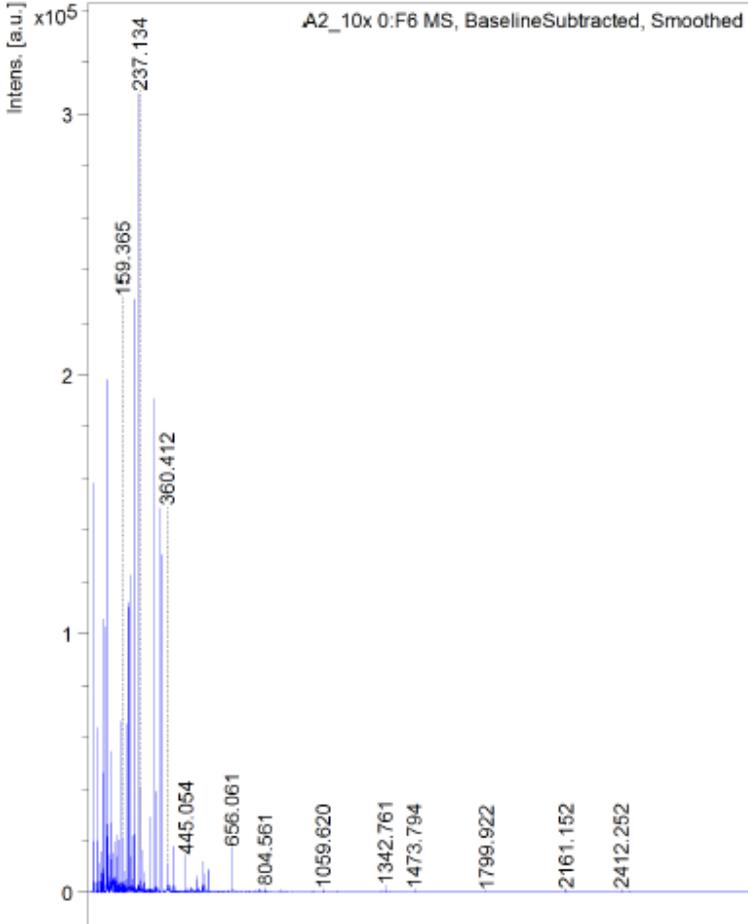


Figura F - Perfil de distribuição de massas molares dos peptídeos liberados após a hidrólise utilizando-se a pepsina com pré-tratamento (pH 2,5, temp. 37 °C, 1% de pepsina e 2% de substrato) e tempo de hidrólise de 6h, de 0 a 5000 Da.

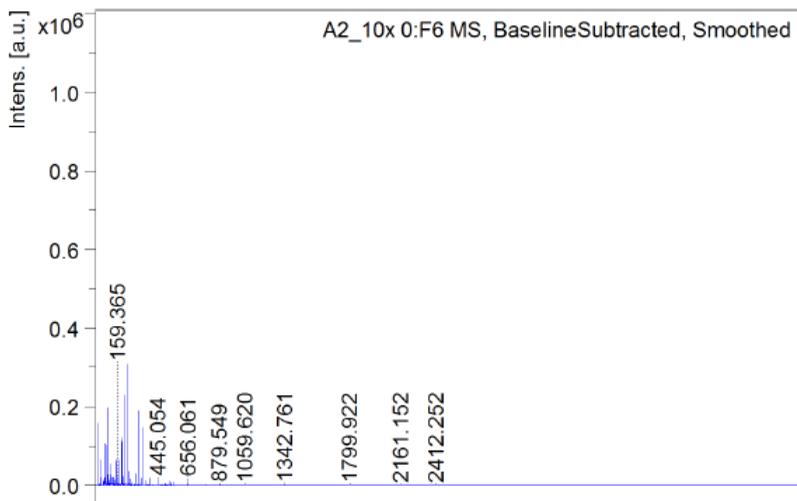


Figura G - Perfil de distribuição de massas molares dos peptídeos liberados após a hidrólise utilizando-se a pepsina com pré-tratamento (pH 2,5, temp. 37 °C, 1% de pepsina e 2% de substrato) e tempo de hidrólise de 6h, de 0 a 10000 Da.

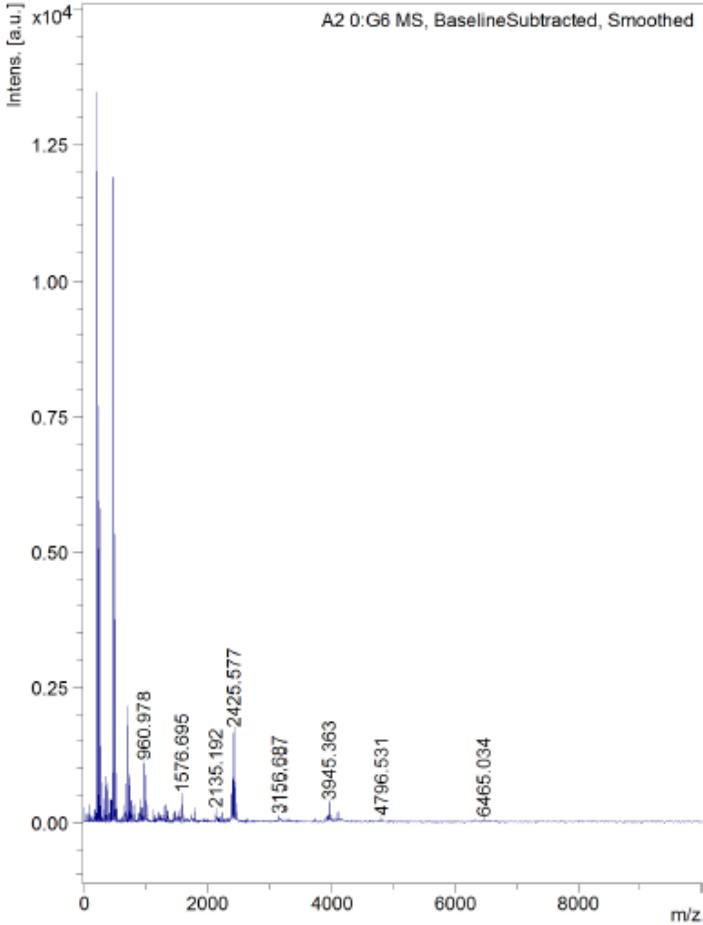


Figura H - Perfil de distribuição de massas molares dos peptídeos liberados após a hidrólise utilizando-se a pepsina com pré-tratamento (pH 2,5, temp. 37 °C, 1% de pepsina e 2% de substrato) e tempo de hidrólise de 6h, de 0 a 20000 Da

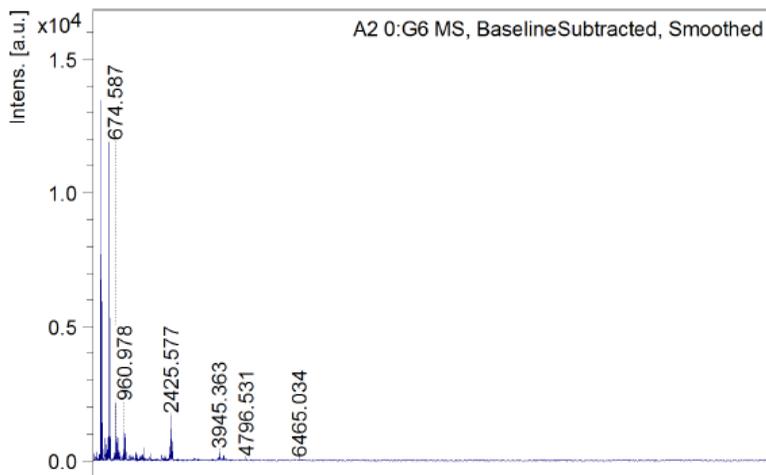


Figura I - Perfil de distribuição de massas molares dos peptídeos liberados após a hidrólise utilizando-se a papaína sem pré-tratamento (pH 7, temp. 50 °C, 1% de papaína e 2% de substrato) e tempo de hidrólise de 6h, de 0 a 3000 Da.

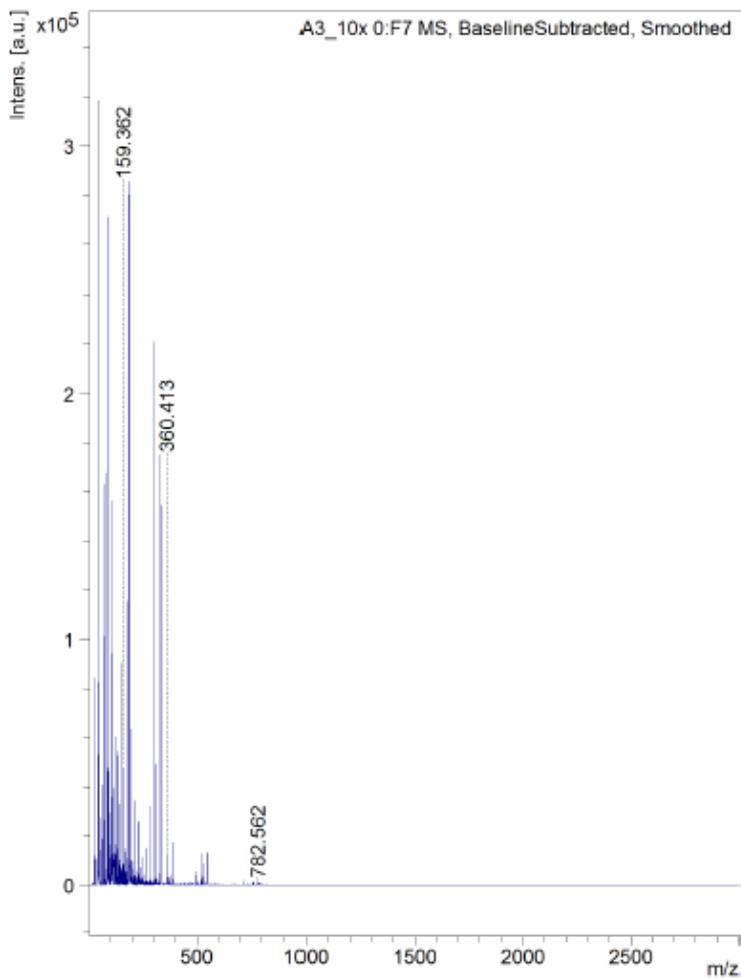


Figura J - Perfil de distribuição de massas molares dos peptídeos liberados após a hidrólise utilizando-se a papaína sem pré-tratamento (pH 7, temp. 50 °C, 1% de papaína e 2% de substrato) e tempo de hidrólise de 6h, de 0 a 5000 Da.

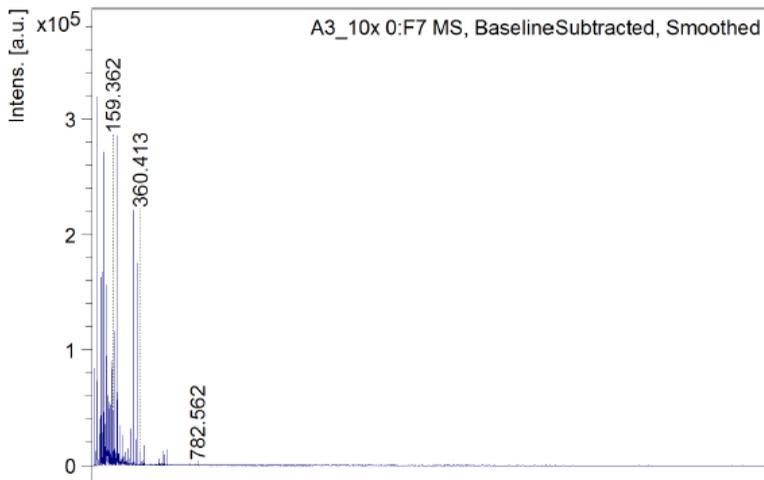


Figura L - Perfil de distribuição de massas molares dos peptídeos liberados após a hidrólise utilizando-se a papaína sem pré-tratamento (pH 7, temp. 50 °C, 1% de papaína e 2% de substrato) e tempo de hidrólise de 6h, de 0 a 20000 Da.

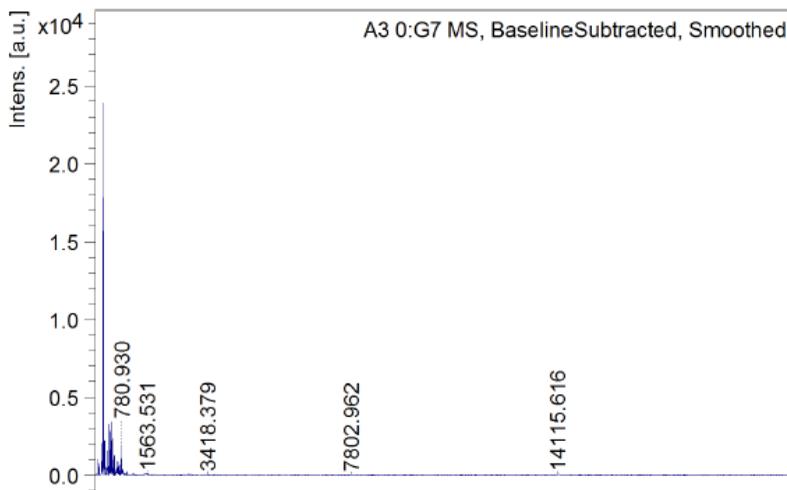


Figura M - Perfil de distribuição de massas molares dos peptídeos liberados após a hidrólise utilizando-se a papaína com pré-tratamento (pH 7, temp. 50 °C, 1% de papaína e 2% de substrato) e tempo de hidrólise de 6h, de 0 a 3000 Da.

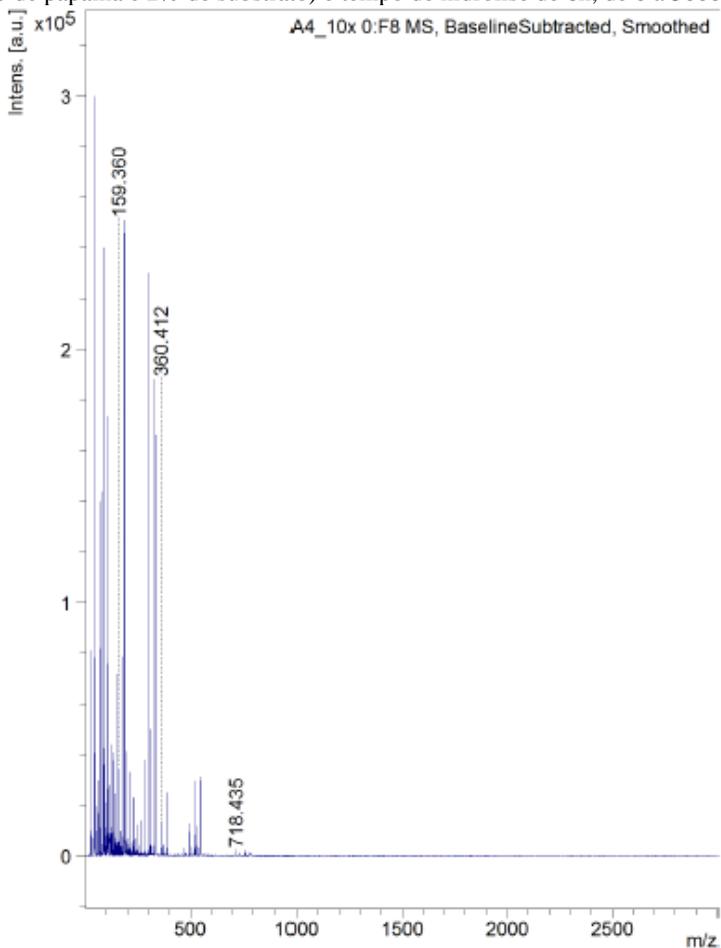


Figura N - Perfil de distribuição de massas molares dos peptídeos liberados após a hidrólise utilizando-se a papaína com pré-tratamento (pH 7, temp. 50 °C, 1% de papaína e 2% de substrato) e tempo de hidrólise de 6h, de 0 a 5000 Da.

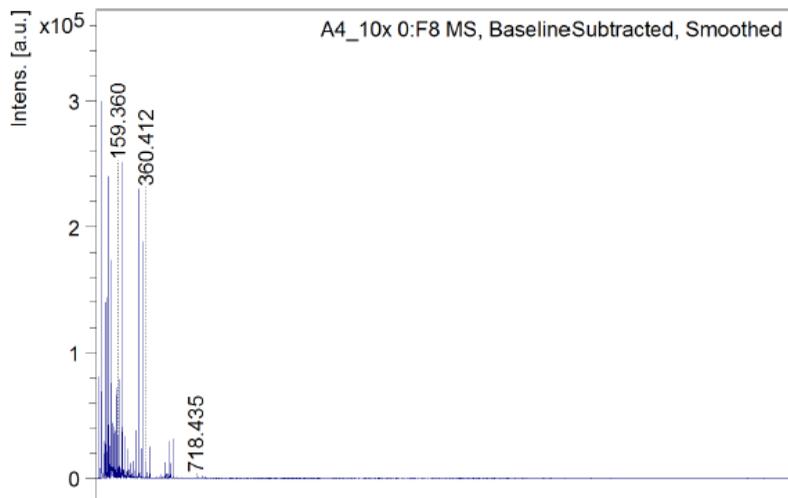


Figura O - Perfil de distribuição de massas molares dos peptídeos liberados após a hidrólise utilizando-se a papaína com pré-tratamento (pH 7, temp. 50 °C, 1% de papaína e 2% de substrato) e tempo de hidrólise de 6h, de 0 a 20000 Da.

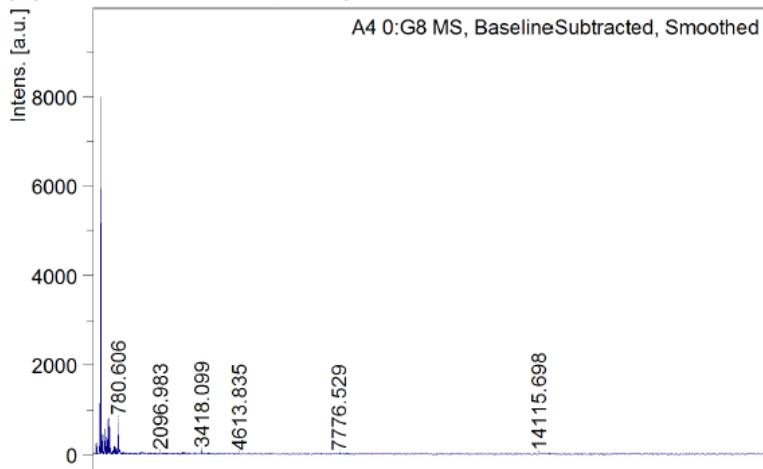


Figura P - Perfil de distribuição de massas molares dos peptídeos do IPS solubilizado, de 0 a 3000 Da.

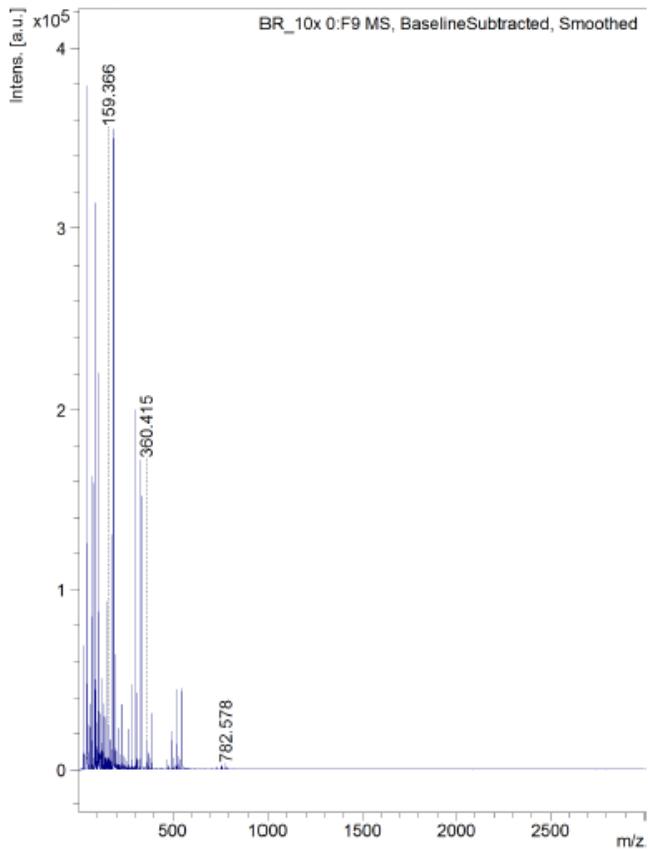


Figura Q - Perfil de distribuição de massas molares dos peptídeos liberados após a simulação gastrointestinal, submetidos a hidrólise utilizando-se a pepsina sem e com pré-tratamento, respectivamente (pH 2,5, temp. 37 °C, 1% de pepsina e 2% de substrato) e tempo de hidrólise de 6h, de 0 a 4500 Da.

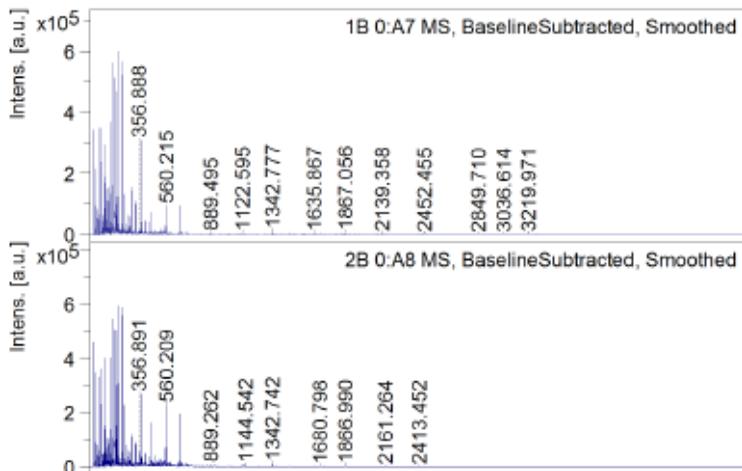


Figura R - Perfil de distribuição de massas molares dos peptídeos liberados após a simulação gastrointestinal, submetidos a hidrólise utilizando-se a pepsina sem e com pré-tratamento, respectivamente (pH 2,5, temp. 37 °C, 1% de pepsina e 2% de substrato) e tempo de hidrólise de 6h, de 500 a 20000 Da.

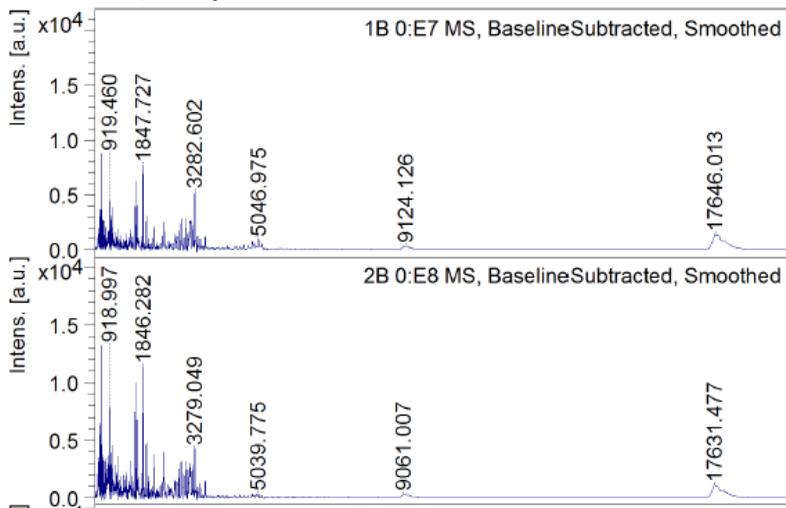


Figura S - Perfil de distribuição de massas molares dos peptídeos liberados após a simulação gastrointestinal, submetidos a hidrólise utilizando-se a papaína sem e com pré-tratamento, respectivamente (pH 7, temp. 50 °C, 1% de papaína e 2% de substrato) e tempo de hidrólise de 6h, de 0 a 4500 Da.

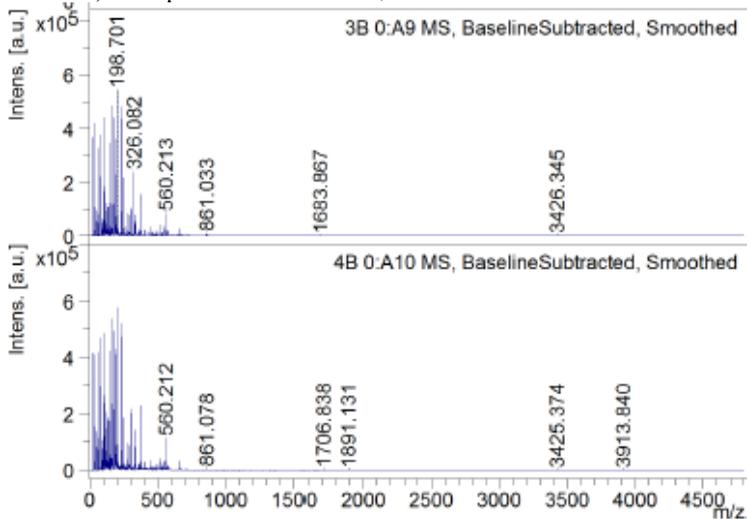


Figura T - Perfil de distribuição de massas molares dos peptídeos liberados após a simulação gastrointestinal, submetidos a hidrólise utilizando-se a papaína sem e com pré-tratamento, respectivamente (pH 7, temp. 50 °C, 1% de papaína e 2% de substrato) e tempo de hidrólise de 6h, de 500 a 20000 Da.

