

EDILZA SILVA DO NASCIMENTO

**OBTENÇÃO DE HIDROLISADO PROTEICO DE SEMENTES
DE QUIABO *Abelmoschus esculentus* (L.) MOENCH E SUA
CAPACIDADE ANTIOXIDANTE**

João Pessoa – PB

2015

EDILZA SILVA DO NASCIMENTO

**OBTENÇÃO DE HIDROLISADO PROTEICO DE SEMENTES
DE QUIABO *Abelmoschus esculentus* (L.) MOENCH E SUA
CAPACIDADE ANTIOXIDANTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal da Paraíba em cumprimento às exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Carlos Alberto de Almeida Gadelha

João Pessoa – PB

2015

N244o Nascimento, Edilza Silva do.
Obtenção de hidrolisado proteico de sementes de quiabo
Abelmoschus esculentus (L.) Moench e sua capacidade
antioxidante / Edilza Silva do Nascimento.- João Pessoa, 2015.
80f. .
Orientador: Carlos Alberto de Almeida Gadelha
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CT
1. Tecnologia de alimentos. 2. Sementes de quiabo.
3. Concentrado proteico. 4. Hidrolisado enzimático.
5. Capacidade antioxidante. 6. Alcalase®.

UFPB/BC

CDU: 664(043)

EDILZA SILVA DO NASCIMENTO

**OBTENÇÃO DE HIDROLISADO PROTEICO DE SEMENTES
DE QUIABO *Abelmoschus esculentus* (L.) MOENCH E SUA
CAPACIDADE ANTIOXIDANTE**

Aprovada em 24/03/15

Banca Examinadora

Profº. Dr. Carlos Alberto de Almeida Gadelha PPGCTA/CT/UFPB

Orientador

Profº. Dr. Flávio Luiz Honorato da Silva PPGCTA/CT/UFPB

Membro Interno

Profª Dra. Maria Teresa Bertoldo Pacheco CCQA/ITAL

Membro Externo

*Ao meu amado Deus,
Tudo o que tenho e sou é para tua glória.*

*Aos meus pais, Clóvis e Maria do Socorro Nascimento,
Pelas orações e todo amor a mim dispensado.*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Sou grata a Deus pelo dom da vida, pela sua infinita graça e misericórdia que me mantêm viva e me acompanham dia após dia. À doce presença do amado Espírito Santo, que me auxiliou a redigir cada parágrafo desse trabalho e em todos os momentos esteve sempre comigo. As palavras do amado Jesus Cristo já anunciavam que Ele estaria conosco: *“E eu rogarei ao Pai, e ele vos dará outro Consolador, a fim de que esteja para sempre convosco, o Espírito da verdade”* (Jo 14.16).

Agradeço aos meus amados pais, Clóvis Nascimento e Maria do Socorro Nascimento, pelo cuidado, carinho, amor, pelas orações, ligações diárias e ainda pela compreensão da minha ausência em suas vidas. Sem o apoio da minha querida mãe e meu amado pai eu não teria chegado ao término desse trabalho. Obrigada pelo amor incondicional, por tudo que me ensinaram na trajetória da vida. Vocês são o que tenho de mais precioso, meu bem maior. Amo vocês!

Agradeço em especial ao meu orientador pelo apoio, ética, seriedade, amizade, disponibilidade, incentivo, e aprendizado repassado ao longo da pesquisa. Agradeço a Deus por ter colocado em minha caminhada do mestrado um orientador que tem um coração humano. Obrigada pela oportunidade e confiança!

Meus agradecimentos a querida professora Dra Maria Teresa Bertoldo Pacheco por ter me recebido em seus laboratórios no CCQA, pela oportunidade de desenvolver parte da minha pesquisa no Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL). Sou grata a Deus por ter conhecido essa pessoa tão especial, dedicada sempre em desenvolver o melhor trabalho. Obrigada por sua disponibilidade, ética, incentivo, apoio, conhecimento transmitido, parceria e amizade. A senhora foi essencial para o desenvolvimento desta pesquisa.

Agradeço a banca de qualificação e defesa composta pelos professores: Dr. Flávio Luiz Honorato da Silva e Dra Maria Teresa Bertoldo Pacheco. Obrigada pelas contribuições dadas para o aperfeiçoamento desse trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela oportunidade de realizar a pesquisa como bolsista.

À Universidade Federal da Paraíba (UFPB), em especial ao Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA), pela oportunidade concedida para a realização do mestrado. À coordenadora do PPGCTA, professora Dra Marta Surely Madruga pelo apoio e disponibilidade.

Aos laboratórios: Laboratório de Proteômica Estrutural (LAPROTE), Laboratório de Bioquímica, Genética e Radiologia (BIOGER), Laboratório de Química de Alimentos (LAQA), do Centro de Ciência e Qualidade de alimentos (CCQA/ITAL), e Laboratório de Bioquímica e Nutrição da FEA/UNICAMP, e seus respectivos coordenadores.

À professora Dra Flávia Maria Netto (UNICAMP), pela disponibilidade em me receber em seu laboratório para desenvolver parte de meus experimentos. Obrigada pela oportunidade! A professora Tatiane Santi Gadelha pelas sugestões e disponibilidade.

Aos professores do PPGCTA, pelo conhecimento transmitido durante o mestrado.

As minhas irmãs Bianca Nascimento e Karla Nascimento, meu cunhado João José, meus amados sobrinhos Arthur Felipe Nascimento e a caçula Valentina Nascimento (saudades!!), que mesmo à distância torcem e acreditam no meu potencial. Aos meus familiares que sempre torcem e intercedem por mim em suas orações.

As minhas amigas Claudia Vasconcelos, Dayanna Joyce, Jessicley Ferreira, Manuela Alves e Jéssica Bezerra que mesmo a distância torcem por mim e me incentivam a continuar a caminhada.

As estagiárias do LAPROTE, Samara Montengro (meu braço direito), Rejane Dionísio e Namíbia, que até nos finais de semana me acompanharam em análises para que eu chegasse ao término desse trabalho. Aos ex estagiários e hoje amigos, Renato e Tatiana pelo apoio.

À turma de mestrado: Lorena Lucena, Suênia Samara, Taliana Bezerra, Fernanda Rodrigues, Fernanda Rolin, Tamires Machado, Maria Helena, Narciza Arcanjo, Rayssa Carvalho, Geane Targino, Leniete Galiza e Lincon Pontes, que em algum momento me incentivaram e me apoiaram. Compartilhamos desafios e superações no decorrer desses dois anos.

As doutorandas Iris Bráz, Angela Lima, Sinara Fragoso, Cassiara Camelo, Isabele e Maristela que foram anjos em minha vida, sempre dispostas a me ajudar.

Aos amigos do DBM Sandro Mascena, Katya Anaya (saudades!), Rodrigo Lacerda e Thalles José. Obrigada pela força, incentivo, conversas e risadas que me fizeram caminhar mais leve nesse processo.

Ao casal de amigos norte-americanos Erick e Jenny Pady. Obrigada pelo apoio, pelas orações, pelas conversas e risadas que me fizeram tão bem.

À secretária do PPGCTA, Lindalva Nóbrega por sua paciência, disponibilidade, atenção, sempre pronta em facilitar nosso trabalho. Agradeço à Lúcio (Iris Braz) e Talita (Thales Lacerda).

À querida pesquisadora Lucia De La Hoz do ITAL, por seu apoio, dicas e explicações, sempre disposta a ensinar.

As estagiárias do ITAL, Bruna, Carmem, Bianca e Mariane, e a técnica Magaly por me auxiliarem nas análises.

As doutorandas Elisa Maria e Fernanda Drumond que me auxiliaram nos experimentos realizados no Laboratório de Bioquímica e Nutrição da UNICAMP.

À técnica Eliana do Laboratório de Bioquímica e Nutrição da FEA/UNICAMP, pelo apoio, incentivo, acolhimento, dicas e auxílio nas análises.

À querida Ziza, dona do pensionato em Campinas. Obrigada pela receptividade, acolhimento, apoio, festa surpresa de aniversário e todo carinho durante minha estadia em Campinas, SP.

À funcionária da limpeza dos laboratórios do PPGCTA, Juliana.

A conclusão dessa dissertação só foi possível pela colaboração de pessoas que Deus colocou em meu caminho, sendo assim, esse trabalho não foi executado somente por mim, mas por todos estes que abençoaram minha vida com sua colaboração. Obrigada a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização desse trabalho.

“Todas as coisas contribuem para o bem dos que amam a Deus”.

*Apóstolo Paulo
(Carta aos Romanos 8.28)*

RESUMO

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são geradas através de reações fisiologicamente normais no organismo humano durante o processo respiratório e exercem diversas funções como sinalização e fornecimento de defesa contra infecções. No entanto, em quantidades excessivas as EROs causam dano celular e estão envolvidas na iniciação ou progresso de doenças crônicas degenerativas. Em contrapartida, os agentes antioxidantes desempenham um papel vital para reduzir os processos oxidativos no organismo. Dentre os quais destacam-se hidrolisados e peptídeos oriundos de fontes proteicas, que demonstram atividade antioxidante. Porém, se faz necessário o processo hidrolítico para que ocorra a liberação dos pequenos fragmentos de peptídeos com capacidade em reduzir as EROs. Todavia, as condições de hidrólise empregadas tais como tipo de enzima, concentração enzimática, pH, tempo e temperatura podem influenciar a formação de peptídeos com propriedades antioxidantes. Desta forma, esse estudo objetivou obter hidrolisado a partir das proteínas de sementes de quiabo com uso da enzima Alcalase® em diferentes condições hidrolíticas e avaliar a capacidade antioxidante dos hidrolisados produzidos. Utilizando um delineamento composto central rotacional (DCCR), foi avaliada a influência das variáveis independentes: concentração enzimática (CE) e tempo de hidrólise (T), sobre as variáveis dependentes: grau de hidrólise (GH), rendimento da recuperação de proteínas (RRP), capacidade antioxidante total (TAC) e sequestro dos radicais 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid (ABTS) e 2,2-diphenyl-1-picrilidrazil (DPPH). Os resultados mostraram que o aumento da CE e T influenciaram positivamente sobre o GH e TAC e apenas o aumento do T influenciou no RRP, a capacidade de eliminação dos radicais ABTS e DPPH não foram influenciadas pelas variáveis independentes. Foi verificado que o aumento da TAC é diretamente proporcional ao aumento do GH. O perfil eletroforético revelou que o concentrado proteico de sementes de quiabo (CPSQ) apresenta bandas proteicas com massas relativas acima de 38 kDa e menor que 8,5 kDa. Foi constatado ainda a eficiência do processo de hidrólise pela Alcalase®, através do desaparecimento da maioria das bandas proteicas e aparecimento de peptídeos de massa molecular < 3,5 kDa nos hidrolisados com maior GH. O CPSQ apresentou menor TAC e capacidade sequestrante dos radicais ABTS e DPPH em comparação aos hidrolisados obtidos. Operando-se as melhores condições das variáveis independentes (CE e T) obtidas no estudo de otimização, a partir da metodologia do DCCR foi possível obter um hidrolisado considerado ótimo, cuja concentração enzimática foi de 2% e tempo de hidrólise de 300 min, nesta condição o hidrolisado resultou em maior GH (19,32%), TAC (51,54%) e resultados expressivos para DPPH (52,60%) e ABTS (73,04%). O hidrolisado ótimo apresentou um teor considerável de aminoácidos com capacidade em doar prótons e elétrons, destacando-se os ácidos (32,90 g/100g de proteína), hidrofóbicos (38,58 g/100g de proteína) e aromáticos (9,43 g/ 100g de proteína). Os resultados evidenciam que o hidrolisado proteico de sementes de quiabo surge como um composto bioativo promissor, com capacidade antioxidante. No entanto, outros estudos são necessários para avaliar os efeitos que o hidrolisado pode produzir *in vivo*, no intuito de constatar a efetividade da atividade antioxidante no organismo humano.

Palavras-chave: Sementes de quiabo. Concentrado proteico. Hidrolisado enzimático. Capacidade antioxidante. Alcalase®.

ABSTRACT

The reactive oxygen species (ROS) are generated through reactions physiologically normal in the human organism during the respiratory process and perform various functions such as signage and providing defense against infections. However, in excessive amounts the ROS cause cellular damage and are involved in the initiation or progression of degenerative chronic diseases. In contrast, the antioxidant agents play a vital role for reduce the processes oxidative in the organism. Among them are hydrolyzed peptides from protein sources and, that demonstrate antioxidant activity. However, it is necessary the hydrolytic process for release of small fragments of amino peptide with the capacity to reduce the ROS. However, the conditions of hydrolysis employed such as type of enzyme, enzyme concentration, pH, time and temperature can influence the formation of peptides with antioxidant properties. Thus, this study aimed to obtain hydrolyzed from okra seed proteins using Alcalase® hydrolytic enzyme in different conditions and evaluate the antioxidant capacity of the hydrolysates produced. Using a Central Composite Rotatable Design (CCRD), was evaluated the influence of independent variables: enzyme concentration (EC) and hydrolysis time (T), on the dependent variables: degree of hydrolysis (DH), protein recovery efficiency (PRE), total antioxidant capacity (TAC) and scavenging of radicals radicaais 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid (ABTS) e 2,2-diphenyl-1-picrilidrazil (DPPH). The results showed that the increase in EC and T influenced positively on DH and TAC and only increased T influenced on the PRE, the ability of eliminating radical ABTS and DPPH were not influenced by the independent variables. It was verified that the increased TAC is directly into proportional to the increase in DH. The electrophoretic profile revealed that okra seed protein concentrate (OSPC), presents protein bands with relative masses above 38 kDa and less than 8.5 kDa. It was also found, the efficiency of the process of hydrolysis by Alcalase®, evidenced by the disappearance of most of the protein bands and the appearance of peptides of molecular mass < 3.5 kDa in hydrolysates with a higher DH. The OSPC showed lower TAC and ability of the ABTS and DPPH radical scavenger in comparison to the hydrolysates obtained. The best operating conditions of the independent variables (EC and T) obtained in the optimization study, using the methodology CCRD was possible to obtain a hydrolyzate considered optimal, the enzyme concentration was 2% and time of hydrolysis of 300 min, in this condition the hydrolyzed resulted in increased DH (19.32%), TAC (51.54%) and significant results for DPPH (52.60%) and ABTS (73.04%). The hydrolyzed great presented a considerable content of amino acids with ability to donate protons and electrons, especially acids (32.90 g/100 g of protein), hydrophobic (38.58 g/100 g of protein) and aromatic (9.43 g/100 g of protein). The results show that the protein hydrolyzate of okra seed emerges as a promising bioactive compound, with antioxid capacity. However, other studies are needed to assess the effects that the hydrolysate can produce *in vivo*, in order to verify the effectiveness of antioxidant activity in the human organism.

Keywords: Okra seeds. Hydrolyzed protein. Enzymatic hydrolyzate. Antioxidant capacity. Alcalase®.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Propriedades relevantes de peptídeos bioativos derivados de proteínas de alimentos com promoção da saúde e prevenção de doenças humana	19
FIGURA 2. Fluxograma de obtenção do concentrado proteico de sementes de quiabo (CPSQ)	28
FIGURA 3. Fluxograma de obtenção do hidrolisados proteicos de sementes de quiabo (HPSQ) a partir do concentrado proteico de sementes de quiabo (CPSQ)	32

ARTIGO I

FIGURA 1. Superfícies de respostas geradas no Delineamento Composto Central rotacional (DCCR) para as variáveis dependentes: (a) Grau de hidrólise (GH), (b) Rendimento da recuperação de proteínas (RRP) e (c) Capacidade antioxidante total (TAC)	61
FIGURA 2. A e B: Perfil eletroforético (SDS/PAGE- Tricina) do CPSQ e dos HPSQs (a): (M) marcador molecular GE, (CP) CPSQ (76g de ptn/100g de amostra) e (H1 a H6) HPSQ- 1 a 6 respectivamente. (b): (M) marcador molecular GE, (CP) CPSQ (76g de ptn/100g de amostra) e (H7 a H11) HPSQ- 7 a 11 respectivamente. Concentrado proteico de sementes de quiabo (CPSQ)/ Hidrolisado proteico de sementes de quiabo (HPSQ).....	62
FIGURA 3. Correlação de <i>Pearson</i> para GH x TAC dos hidrolisados proteicos obtidos a partir do CPSQ ($p < 0,05$)	62

ARTIGO II

FIGURA 1. Perfil eletroforético (SDS/PAGE- Tricina) do CPSQ e HPSQ (1) marcador molecular GE, (2) CPSQ (76g de ptn/100g de amostra) e (3) HPSQ (65,13g de ptn/100g de amostra) (Grau de hidrólise: (19,32%)).....	75
--	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Níveis reais e codificados do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para a hidrólise do CPSQ a partir da enzima Alcalase®.....	29
---	----

TABELA 2. Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para duas variáveis independentes na hidrólise do CPSQ a partir da enzima Alcalase®	30
--	----

ARTIGO I

TABELA 1. Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) e respostas para o Grau de hidrólise (GH), Rendimento da recuperação de proteínas (RRP), Capacidade antioxidante total (TAC), Eliminação dos radicais DPPH e ABTS do hidrolisado proteico obtido por utilização da enzima Alcalase®	63
--	----

TABELA 2. Equações do modelo codificado, razão F_{cal}/F_{tab} e R^2 para as variáveis respostas: Grau de hidrólise (GH), Rendimento da recuperação de proteínas (RRP) e Capacidade antioxidante total (TAC)	63
---	----

TABELA 3. Capacidade de eliminação dos radicais DPPH e ABTS do concentrado proteico de sementes de quiabo (CPSQ) e hidrolisados proteicos de H1 a H11 obtidos no Delineamento Composto Central Rotacional (DCRR)	64
---	----

ARTIGO II

TABELA 1. Composição centesimal aproximada: Farinha integral de sementes de quiabo (FISQ), farinha desengordurada de sementes de quiabo (FDSQ), concentrado proteico de sementes de quiabo (CPSQ) e hidrolisado proteico de sementes de quiabo (HPSQ) (g/100g)	70
---	----

TABELA 2. Capacidade antioxidante total (TAC) e de eliminação dos radicais DPPH e ABTS do concentrado proteico de sementes de quiabo (CPSQ) e hidrolisado proteico de sementes de quiabo (HPSQ)	71
--	----

TABELA 3. Composição de aminoácidos totais (g/100g de proteína) do concentrado proteico de sementes de quiabo (CPSQ) e hidrolisado proteico de sementes de quiabo (HPSQ)	72
---	----

TABELA 4. Composição de aminoácidos livres (g/100g de proteína) do hidrolisado proteico de sementes de quiabo (HPSQ)	74
---	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 ENZIMAS PROTEOLÍTICAS PARA PRODUÇÃO DE HIDROLISADOS	15
2.2 HIDROLISADO PROTEICO E PEPTÍDEOS BIOATIVOS EM ALIMENTOS	17
2.3 RADICAIS E LIVRES E ANTIOXIDANTES	20
2.4 PEPTÍDEOS ANTIOXIDANTES EM ALIMENTOS	21
2.5 CULTURA E UTILIZAÇÃO DO QUIABO	23
3 MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 MATERIAL	26
3.2 OBTENÇÃO DO CONCENTRADO PROTEICO DE SEMENTES DE QUIABO	26
3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	29
3.4 OBTENÇÃO DOS HIDROLISADOS PROTEICOS DE SEMENTES DE QUIABO	30
3.5 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS	33
3.5.1 Composição centesimal	33
3.5.2 Determinação de aminoácidos totais	33
3.5.3 Determinação de aminoácidos livres	33
3.6 PERFIL ELETROFORÉTICO- SDS-PAGE-TRICINA	34
3.7 ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	34
3.7.1 Determinação da Capacidade antioxidante total (TAC)	34
3.7.2 Determinação da Capacidade antioxidante do radical DPPH	35
3.7.3 Determinação da Capacidade antioxidante do radical ABTS	36
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
REFERÊNCIAS	37
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	80

1 INTRODUÇÃO

A produção descontrolada de espécies reativas de oxigênio leva ao estresse oxidativo que é responsável pela oxidação das células e danos em biomoléculas importantes, como proteínas, lipídeos e DNA (DURACKOVÁ, 2010). O estresse oxidativo tem sido relacionado com a iniciação ou progresso de doenças não-transmissíveis, incluindo diabetes mellitus, câncer e aterosclerose (MATSUDA; SHIMOMURA, 2013). Compostos bioativos derivados de alimentos têm sido descritos como fontes potenciais para auxiliar na prevenção de vários processos oxidativos no organismo humano, retardando ou impedindo o estresse oxidativo e consequentemente o aparecimento e progresso de doenças (LI-CHAN, 2015). No âmbito científico, nas últimas décadas um novo campo de pesquisa se abriu a partir de diversos estudos desenvolvidos na obtenção de hidrolisados proteicos e peptídeos com capacidade para eliminação de radicais livres (SARMADI; ISMAIL 2010).

A capacidade antioxidante dos fragmentos obtidos a partir de moléculas proteicas está relacionada com a presença de alguns aminoácidos na sua estrutura primária, sequência aminoacídica e estrutura conformacional. Estes seriam responsáveis pela transferência de radicais entre os resíduos de aminoácidos (ARCAN; YEMENICIOGLU, 2010). Muitos peptídeos são encontrados inativos dentro da matriz proteica, sendo necessário processos hidrolíticos para que ocorra a liberação dos pequenos fragmentos compostos por diferentes sequências de aminoácidos, com massa molecular reduzida, aumento do número de grupos ionizáveis e exposição de grupos hidrofóbicos com maior capacidade de eliminação de radicais livres (MOLLER et al., 2008).

Os pesquisadores Samaranayaka; Li-Chan (2011) e Sarmadi; Ismail (2010), relataram que diversos peptídeos antioxidantes foram identificados a partir de hidrolisados de fontes proteicas de origem animal, tais como soro do leite, ovos, peixes. Assim como em diferentes fontes de proteínas vegetais, tais como soja, milho, sementes de girassol e inhame, entre outras. Os autores supracitados referem que esses produtos originados da hidrólise proteica podem ser utilizados como antioxidantes naturais para retardar processos oxidativos em alimentos e no organismo humano, com benefícios à saúde.

Fontes proteicas vegetais cultivadas localmente e que são pouco exploradas, podem surgir como novas perspectivas na área de compostos biologicamente ativos. O quiabo (*Abelmoschus esculentus* L. Moench) originário da Etiópia-África, pertence à família Malvaceae, é uma hortaliça bastante difundida na região nordeste do país, pois se adapta ao clima tropical brasileiro. As sementes desta hortaliça apresentam um considerável teor de

proteínas (22,4%) (SOARES et al., 2012). Estas sementes têm sido valorizadas na cultura alimentar e empregadas como terapêutico na medicina popular em algumas partes do mundo (JARRTE; WANG; LEVY, 2011). Diante do exposto, visando agregar valor as proteínas de sementes do quiabo, a presente pesquisa teve como objetivos obter o hidrolisado das proteínas de sementes de quiabo a partir do uso da enzima Alcalase® em diferentes condições hidrolíticas e avaliar a capacidade antioxidante do hidrolisado produzido.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ENZIMAS PROTEOLÍTICAS PARA PRODUÇÃO DE HIDROLISADOS PROTEICOS

As enzimas proteolíticas são produzidas por diversos microrganismos: como vírus, bactérias, leveduras e fungos e ainda por vegetais e animais superiores. As enzimas proteolíticas são produzidas por diversos microrganismos: como vírus, bactérias, leveduras e fungos e ainda por animais superiores. As enzimas constituem um grupo grande e complexo de macromoléculas biológicas, as quais diferem entre si por sua especificidade, pelo tipo de substrato, concentração enzimática, sítio ativo e mecanismo catalítico, perfis de estabilidade, atividade, temperatura e pH (BEYNON; BOND, 2001).

As proteases ou enzimas proteolíticas catalisam a hidrólise de ligações peptídicas de proteínas. De acordo com a Enzyme Commission of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB), estas enzimas estão classificadas dentro do grupo das hidrolases (BERGMANN, 2006; BARETT, 1994). Conforme referido por Rao et al. (1998), as proteases são divididas em dois grupos principais, de acordo com o seu sítio de ação, o grupo das exopeptidases (carboxipeptidase, aminopeptidase, dipeptidases, tripeptidase e flavourzyme) que clivam as ligações peptídicas próximas ao grupamento amino ou carboxi terminal no substrato, e o grupo das endopeptidases (tripsina, quimotripsina, pepsina e alcalase) que clivam ligações peptídicas distantes do grupo terminal do substrato.

As proteases microbianas são preferidas para aplicações biotecnológicas, para processos hidrolíticos, uma vez que apresentam características desejadas para obtenção de hidrolisados que apresentam atividades biológicas, além do menor custo, comparado às enzimas vegetais e de origem animal (SAID; PIETRO, 2002). De acordo com Diniz, Martin (1999), a produção de proteases por microrganismos é comum entre os gêneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Aspergillus*, *Streptomyces* e *Rhizopus*.

O uso de enzimas proteolíticas para produção de hidrolisados proteicos e peptídeos vem sendo relatado por diversos estudiosos no decorrer dos anos. A maioria desses estudos tem referido o uso das proteases: Alcalase® (bacteriana), Flavourzyme® (fúngica) e a pancreatina que é um complexo enzimático produzido a partir do pâncreas. (LEE; LEE; LEE, 2000; SATHIVEL et al. 2005; MEGÍAS et al, 2009; TSOU et al., 2010; SEGURA-CAMPOS et al., 2013; VALDEZ-ORTIZ et al., 2012; DE LA HOZ et al., 2014; ESTEVE; MARINA; GARCÍA, 2015).

A enzima Alcalase® é uma protease de origem bacteriana, alcalina, produzida por *Bacillus licheniformis* (SUKAN; ANDREWS, 1982). De acordo com Zhu, Zhou, Qian (2006) e Yang et al. (2011), essa enzima apresenta atividade de endopeptidase, com ampla especificidade, que atua clivando, preferencialmente, a porção carbóxi terminal dos aminoácidos: ácido glutâmico, metionina, lisina, tirosina e glutamina. Muitos pesquisadores consideram que a Alcalase® é umas das melhores enzimas na obtenção de hidrolisados proteicos, devido às diversas propriedades funcionais obtidas no hidrolisado. Além disso, a enzima possui grande capacidade hidrolítica para produção de hidrolisados de proteínas de origem vegetal e tem sido amplamente utilizada devido ao seu baixo custo (HOYLE; MERRITT, 1994; SHAHIDI, HAN; SYNOWIECKI, 1995; YANG et al., 2011).

A enzima Flavourzyme® é uma protease de origem fúngica, produzida pela fermentação de uma linhagem selecionada de *Aspergillus oryzae*, que atua na hidrólise sob condições neutras ou ligeiramente ácidas (SLIZYTE et al., 2005). Essa enzima apresenta maior atividade como exopeptidase, desta forma, libera grande quantidade de aminoácidos livres (NCHIENZIA; MORAWICKI; GADANG, 2010). Kristinsson; Rasco (2000), referem que a flavourzyme tem sido amplamente utilizada na produção de hidrolisados proteicos com excelentes propriedades funcionais.

A pancreatina é um complexo enzimático produzido no pâncreas, constituído de lipases, amilases, ribonucleases e proteases (PARK, 2001). Conforme reportado por Yamamoto (1975), as proteases pancreáticas (quimotripsina, tripsina, elastase e collagenase) atuam como endopeptidases e as carboxipeptidases A e B possuem ação de exopeptidases. Segundo Adler-Nissen (1993), as enzimas carboxipeptidase, tripsina e quimotripsina apresentam pH ótimo entre 7 e 9, e são classificadas como serino proteases por apresentarem cadeias laterais de serina como parte essencial do seu sítio catalítico.

É importante ressaltar que assim como ocorre na maioria das reações químicas, a velocidade das reações enzimáticas aumenta de acordo com o aumento da temperatura, dentro da faixa de temperatura na qual a enzima é estável (LENINGHER; NELSON; COX, 1995). De forma geral, as enzimas possuem estruturas muito sensíveis a temperaturas elevadas, portanto, acima da faixa ótima de temperatura ocorre desnaturação térmica da enzima e perda da atividade (WHITAKER, 1994).

A atividade catalítica requer integridade da estrutura tridimensional, dependendo de interações hidrofóbicas e hidrofílicas da enzima que, em última instância, são afetadas pelo pH. Alterações nesse parâmetro podem alterar o sítio ativo, diminuindo a atividade catalítica

ou mesmo desnaturando a enzima, com perda irreversível da atividade enzimática (LENINGHER; NELSON; COX, 1995).

A concentração do substrato é uma variável de grande importância, pois afeta diretamente a velocidade cinética da reação catalisada por uma enzima, a qual pode ser analisada mediante o monitoramento das reações hidrolíticas iniciais. O modelo cinético mais simples é o de Michaelis-Menten, bastante utilizado para representar a influência da concentração do substrato na velocidade da reação, que considera a existência do complexo enzima-substrato (LENINGHER; NELSON; COX, 1995). A concentração enzimática também influencia diretamente na velocidade da reação catalítica, a relação do ensaio deve ser linear, ou seja, a velocidade da formação do produto deve ser constante durante todo tempo de ensaio (GIORDANO, 1987).

Conforme referido por Kim et al. (2007), o grau de hidrólise atingido durante a reação, bem como a determinação dos grupos terminais dos peptídeos obtidos, ocorre de acordo com a atividade e especificidade da enzima utilizada na reação hidrolítica. Sendo assim, a escolha da enzima proteolítica é de extrema importância, pois sua ação específica tem influência direta na composição final dos produtos de hidrólise (HAQUE; MOZAFFAR, 1992).

Os pesquisadores Kim; Park; Rhee (1990), ressaltam que a fonte inicial de proteína e as condições do processo de hidrólise, são fatores que influenciam na produção de hidrolisados e peptídeos com atividades biológicas distintas. Desta forma, fica evidente que a seleção adequada da enzima e o controle das condições hidrolíticas constituem-se como etapas importantes do processo de obtenção de hidrolisados proteicos.

2.2 HIDROLISADO PROTEICO E PEPTÍDEOS BIOATIVOS EM ALIMENTOS

O processo de hidrólise proteica consiste na clivagem química ou enzimática de moléculas de proteínas, transformando-as em peptídeos de tamanhos diversos e, eventualmente, em aminoácidos livres. As hidrólises do tipo ácida ou alcalina tendem a ser processos de difícil controle e resultam em produto com reduzida qualidade nutricional. Esses processos de hidrólise são inespecíficos, podendo destruir aminoácidos como triptofano, lisina, treonina e causar a racemização da maioria dos aminoácidos, comprometendo o valor nutricional da proteína (CLEMENTE, 2000; ADLER-NISSEN, 1986). Segundo Espejo-Carpio et al. (2013), a abordagem da hidrólise enzimática para a liberação de peptídeos bioativos com potencial funcional a partir da proteína intacta, permite a otimização do

rendimento destas biomoléculas por possibilitar a escolha do substrato, das enzimas específicas e das condições de reação.

A hidrólise enzimática pode ocorrer, *in vivo* por ação de enzimas do trato digestivo e/ou por enzimas da microbiota intestinal e *in vitro* por ação de enzimas exógenas (MÖLLER et al., 2008). De acordo com Perczel; Hudaky; Csizmadia (2000), os peptídeos gerados no processo hidrolítico são de diferentes tamanhos, podendo estar ligados por dois ou mais aminoácidos que se ligam entre si por uma ligação amida, sendo classificados em dipeptídeos (dois aminoácidos unidos por uma ligação amida), tripeptídeos (três aminoácidos unidos por duas ligações amida), tetrapeptídeos (quatro aminoácidos unidos por três ligações amida) e, finalmente, polipeptídios (mais de três ligações de amida unindo os aminoácidos), com massa molecular elevada em comparação as demais classes.

O hidrolisado obtido das proteínas pode ser submetido a processos de fracionamento para originar uma preparação de peptídeos e ainda seguir passos adicionais de purificação para o isolamento dos peptídeos bioativos (LI-CHAN, 2015). De acordo com Sarmadi; Smail (2010); Wu; Ding (2002), a utilização de hidrolisados proteicos, contendo a mistura de todos os peptídeos, também demonstram atividades biológicas quando aplicados em alimentos.

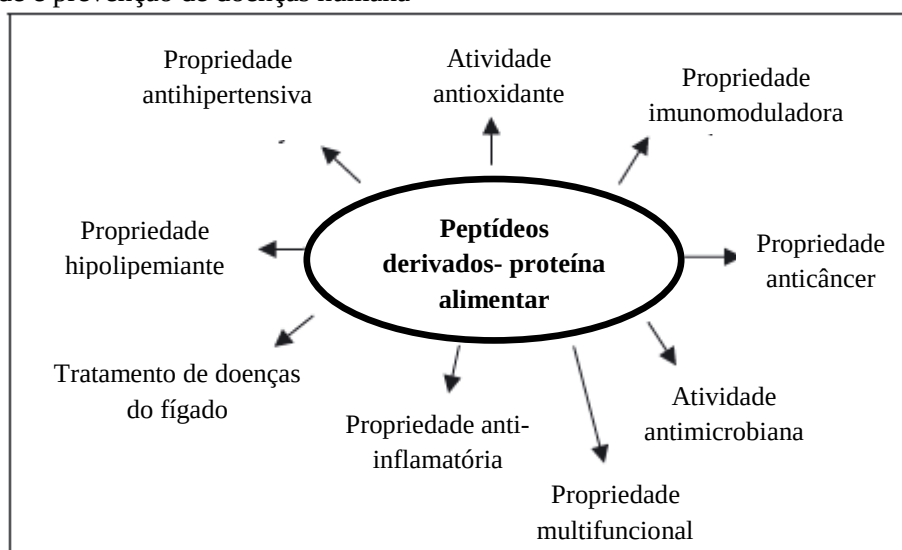
Segundo Samaranayaka; Li-Chan (2011), a hidrólise com a utilização de enzimas tem se constituído o principal processo para a produção de peptídeos com atividades biológicas a partir de proteínas de alimentos. A bioatividade obtida a partir de hidrolisados de proteínas é dependente do tipo de enzima utilizada no processo catalítico, do tipo de substrato e das condições de hidrólise da proteína (SARMADI; ISMAIL, 2010). Conforme Arcan; Yemenicioglu (2010), a modificação enzimática é de extrema importância, pois pode acentuar o potencial bioativo das proteínas, liberando fragmentos que tenham um impacto positivo sobre as funções do organismo, que podem influenciar positivamente na saúde humana. A sequência de aminoácidos específicos, seja na forma de peptídeos ou fragmentos de proteínas, interage sinalizando e modulando a maioria dos processos naturais dentro do corpo. Desta forma, os peptídeos se constituem com futuro promissor para uma ampla gama de aplicações terapêuticas (FIELDS et al., 2009).

Hidrolisados proteicos de alimentos exibem diferentes atividades biológicas, que são, em grande parte, devido aos seus peptídeos constituintes (UDENIGWE; ALUKO, 2012). Algumas dessas atividades biológicas de peptídeos derivados de proteína alimentar estão mostradas na Figura 1.

Dentre os estudos com peptídeos obtidos a partir de hidrolisados, que demonstram benefícios para a saúde, encontram-se as pesquisas com proteínas de sementes oleaginosas

(GARCÍA et al., 2013). Peptídeos com atividades biológicas, tais como antimicrobiana, antioxidante e anti-hipertensiva já foram descritos em sementes de chia, linhaça, girassol, de colza, milho, amendoim, , quinoa, amaranto e soja (SEGURA-CAMPOS et al., 2013; SILVA et al., 2012; FRITZ et al., 2011; REN et al., 2010; MEGÍAS et al., 2009; PEDROCHE et al., 2004; SILVA-SÁNCHEZ et al., 2008; YUST et al., 2004; ALUKO, MONU, 2003). Além dos peptídeos descritos de fontes de origem animal, como em ovos, proteína do soro do leite e subprodutos de surimi (WANG et al., 2014; CHEN et al., 2012; CONTRERAS et al., 2011).

Figura 1: Propriedades relevantes de peptídeos bioativos derivados de proteínas de alimentos com promoção da saúde e prevenção de doenças humana



Adaptado: Udenigwe; Aluko, 2012

A capacidade dos peptídeos em reduzir a pressão sanguínea, ocorre por inibição da enzima conversora da angiotensina (ECA), que modula o controle da pressão sanguínea. Desta forma, estes peptídeos podem ser uma alternativa para o tratamento da hipertensão (VERMEIRSEN; CAMP; VERSTRAET, 2004; VIOQUE; MILLÁN, 2006). Liu; Finley (2005), constataram que peptídeos antioxidantes são capazes de retardar o processo de oxidação celular *in vivo*, com redução do risco do desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis.

Na pesquisa de De La Hoz et al. (2014), constatou-se a capacidade de ligação de pequenos peptídeos ao ferro para formar quelatos, contribuindo para solubilidade e estabilidade do ferro, resultando em melhoria na biodisponibilidade do ferro no processo de digestão gastrointestinal simulada. Tidona et al. (2011), estudando a atividade antimicrobiana de peptídeos obtidos de frações de leite de asnos, encontraram redução significativa do

crescimento de *Escherichia coli* 10.208.355. A atividade antimicrobiana também foi relatada no estudo de Demers-Mathieu et al. (2013), cuja fração peptídica obtida da proteína de soro de leite hidrolisada com tripsina, apresentou inibição do crescimento de bactérias patogênicas (*L. monocytogenes* e *S. aureus*). Esses relatos sugerem a possibilidade do uso de hidrolisados e peptídeos como conservantes naturais, contribuindo para segurança alimentar.

Segundo Fields et al. (2009); Singh; Vij; Hati (2014), diferentes peptídeos bioativos já foram descritos em bancos de dados. O BIOPD (bioactive polypeptide database), contém em seu sistema mais de 1250 peptídeos identificados com diferentes funções bioativas. Já o BIOPEP, desenvolvido na Universidade de Warmia e Mazury na Polônia é o único que concentra principalmente peptídeos de origem alimentar, contendo registros de mais de 1500 peptídeos. Através desse sistema é possível gerar perfis de potencial biológico e atividade de proteínas de interesse, bem como a frequência de ocorrência de fragmentos bioativos na proteína.

O BIOPEP é um banco de dados que oferece ao usuário informações acerca de sequências e peptídeos biologicamente ativos, tais como antioxidante, antimicrobiana, anticâncer, anti-hipertensiva, dentre outros. Essas bases são de grande utilidade para o conhecimento das informações necessárias para identificação de peptídeos isolados a partir de proteínas hidrolisadas (MINKIEWICZ et al., 2008).

2.3 RADICAIS LIVRES E COMPOSTOS ANTIOXIDANTES

Os radicais livres são espécies químicas com um ou mais elétrons desemparelhados, que possuem vida curta e são altamente reativos (DURACKOVÁ, 2010). Dentre os radicais livres destacam-se as espécies reativas de oxigênio (EROs), que são formadas a partir do metabolismo energético e do consumo de oxigênio intracelular por meio de reações da cadeia respiratória que acontecem na mitocôndria (WICKENS, 2001; MARTÍNEZ-CAYUELA, 1995). O radical superóxido ($O_2\cdot$) é formado a partir da redução do O_2 com um elétron (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ocorre por redução de dois elétrons de oxigênio ou a dismutação do $O_2\cdot$ determina a formação do H_2O_2 (COMHAIR; ERZURUM, 2002), e o radical hidroxila ($OH\cdot$) é considerado o radical mais reativo que se conhece nos sistemas biológicos (VALKO et al., 2007).

Em condições fisiológicas os radicais livres produzidos podem exercer diversas funções no organismo, tais como a sinalização celular e fornecimento de defesa contra infecções (VALKO et al., 2006). Além da geração endógena de agentes oxidantes decorrentes

dos processos fisiológicos, os sistemas biológicos estão expostos continuamente aos agentes radicalares por meio de poluentes, radiações, fumaça de cigarro, dentre outros (RAHMAN, 2003; STARCEVIC et al., 2003).

Quando ocorre um desequilíbrio da produção dos agentes oxidantes e metabólitos reativos se desencadeia o estresse oxidativo, que é responsável pela oxidação das células e danos em biomoléculas importantes, como proteínas, lipídeos e DNA (DURACKOVÁ, 2010). Neste sentido, o estresse oxidativo tem sido associado a iniciação ou progresso de várias doenças, tais como doenças neurodegenerativas, Alzheimer, Parkinson, diabetes mellitus (ARUOMA et al., 2007; MUCHOVÁ et al. 1999), síndrome metabólica, doenças tumorais (KLAUNIG, KAMENDULIS 2004, VALKO et al., 2006, GHAFARI, 2008), aterosclerose e doenças cardiovasculares (PECHÁŇ et al. 2003, BALLINGER, 2005; CHERUBINI et al., 2005).

Para combater a produção excessiva de agentes oxidantes e seus metabólitos, o organismo desenvolve sistemas e mecanismos de proteção endógenos (superóxido-dismutase, glutathione peroxidase, catalase, transferrina), que atuam contra os efeitos tóxicos do estresse oxidativo (DURACKOVÁ, 2010). Para intensificar a capacidade de defesa no organismo se faz necessário o consumo de alimentos que contenham em sua composição substâncias com capacidade antioxidante, estas irão atuar em conjunto com os antioxidantes endógenos a fim de minimizar os efeitos prejudiciais provocados pelo estresse oxidativo (VALTUEÑA et al., 2008).

A literatura descreve acerca de várias substâncias oriundas de alimentos que possuem ação antioxidante comprovada, como a vitamina E (α -tocoferol), vitamina C (ácido ascórbico); β -caroteno (pró-vitamina A) e compostos fenólicos como flavonoides e ácidos fenólicos (LIMÓN-PACHECO; GONSEBATT, 2009; HELENO et al., 2015). Recentemente proteínas e peptídeos estão sendo reconhecidos como compostos com capacidade de eliminar radicais livres. Nessa perspectiva, a comunidade científica tem voltado à atenção para a descoberta de peptídeos em fontes alimentares de origem animal e vegetal, a fim de avaliar o potencial antioxidante destas moléculas proteicas derivadas de alimentos e suas possíveis aplicações para o aproveitamento como potenciais agentes antioxidantes (SAMARANAYAKA; LI-CHAN, 2011).

2.4 PEPTÍDEOS ANTIOXIDANTES EM ALIMENTOS

Estudos tem investigado os efeitos como antioxidantes dos fragmentos de moléculas proteicas de alimentos por duas formas de obtenção, seja como hidrolisado proteico ou como peptídeos bioativos. O hidrolisado proteico é uma mistura composta principalmente por peptídeos e aminoácidos que são produzidos por meio de hidrólise de proteínas, por ação enzimática, tratamento ácido ou alcalino ou ainda por fermentação. Os peptídeos bioativos, por outro lado, são vários aminoácidos ligados purificados a partir de hidrolisados obtidos de fontes proteicas. Um grande número de estudos com esses fragmentos obtidos a partir de proteínas de alimentos ou subprodutos de origem animal e vegetal, tem mostrado resultados promissores como potenciais compostos antioxidantes (SARMADI; ISMAIL, 2010).

Arcan e Yemenicioglu (2010), referem que a atividade antioxidante de moléculas proteicas está relacionada com a presença de alguns aminoácidos na estrutura primária e a sequência destes na estrutura conformacional que influencia na transferência de radicais entre os resíduos de aminoácidos. O processo hidrolítico provoca alterações na estrutura tridimensional da proteína, contribuindo assim para aumentar a exposição dos resíduos de aminoácidos, possibilitando a sua atuação como quelantes, sequestradores de radicais, redutores de hidroperóxidos e de aldeídos (ELIAS; KELLERBY; DECKER, 2008).

O mecanismo de ação dos aminoácidos antioxidantes foi descrito por Samaranayaka; Li-Chan, (2011); Sarmadi; Ismail (2010) e Elias; Mcclements; Decker (2005), envolvendo os resíduos de alguns aminoácidos que são capazes de doar prótons ou elétrons aos radicais livres. Aminoácidos básicos e ácidos contêm grupos carboxilo e amino terminais, os quais atuam como agentes quelantes de íons de metal e como doadores de hidrogênio. Assim, os aminoácidos ácido glutâmico, ácido aspártico, lisina, arginina e histidina possuem a capacidade de quelar cátions metálicos e reduzir hidroperóxidos; já tirosina, triptofano e fenilalanina doam elétrons e prótons; enquanto que histidina é doador de prótons e os aminoácidos com grupamento sulfidril das cisteínas, também possuem a capacidade de atuarem no sequestro de radicais livres.

Um número crescente de estudos nos últimos anos tem descrito sobre hidrolisados e peptídeos de fontes alimentares com capacidade de eliminação de radicais livres. Dentre os quais, peptídeos derivados de proteína de origem vegetal, tais como soja e seus produtos (SINGH; VIJ; HATI, 2014; YANG et al., 2011); sementes de chia (SEGURA-CAMPOS et al., 2013), oliva (ESTEVE; MARINA; GARCIA, 2015), girassol (MEGÍAS et al., 2008), variedades de feijões (VALDEZ-ORTIZ et al., 2012), milho (ZHUANG; TANG; YUAN, 2013), grão de bico (ZHANG et al., 2011), amendoim (JAMDAR et al., 2010) e torta de óleo de dendê (NG et al., 2013).

Na pesquisa sobre peptídeos derivados de alimentos, os peptideos de origem vegetal parecem ser uma escolha de resultados mais promissores, uma vez que as plantas são fontes de compostos biologicamente ativos, e a sua atividade principal é atribuída à capacidade antioxidante (NAGAI et al., 2007). Sarmadi; Ismail (2010), enfatizaram a importância dos produtos com peptideos bioativos derivados de plantas, pois estes podem atender também as necessidades de vegetarianos e pessoas com restrições de proteína animal e podem ser considerados importantes fontes de fragmentos proteicos com potencial benefícios à saúde.

Outras pesquisas desenvolvidas com proteínas de origem animal, também resultaram em hidrolisados e peptídeos com potencial antioxidante, como em surimi (WIRIYAPHAN; CHITSOMBOON; YONGSAWADIGUL, 2012), ostras (WANG et al., 2014), ovos (CHEN et al., 2012), proteína do soro do leite (CONTRERAS et al., 2011), peixe (CHALAMAIAH et al., 2012), entre muitas outras fontes descritas na literatura científica.

Quanto à aplicação dos produtos da hidrólise proteica, a FDA (2011), permite a incorporação de hidrolisados de proteínas vegetais em alimentos como aditivos alimentares nos Estados Unidos. Vários estudos relataram que a atividade antioxidante de hidrolisados de proteínas e peptídeos isolados a partir de fontes como a gema de ovo, gelatina e filé de pescada é superior a do α -tocoferol, semelhante ou maior que a atividade de antioxidantes sintéticos habitualmente utilizados tais como BHA e BHT. Além disso, o uso de antioxidantes naturais produzidos a partir de proteínas é considerado seguro e não necessita de regulamentação sobre a dosagem permitida (SAMARANAYAKA; LI-CHAN, 2011).

Em diversos países é permitido o uso de hidrolisados e peptídeos como ingredientes alimentares e muitos destes produtos naturais já estão disponíveis no mercado (SCHAAFSMA, 2009; HARTMANN; MEISEL, 2007). Estes produtos representam uma proposta promissora como valiosos ingredientes funcionais em dietas saudáveis, com impacto na redução do estresse oxidativo, bem como o risco de várias doenças degenerativas tais como câncer, doenças cardiovasculares, inflamatórias e as demais associadas ao estresse oxidativo (LI-CHAN, 2015).

2.5 CULTURA E UTILIZAÇÃO DO QUIABO

O quiabo (*Abelmoschus esculentus*) Moench L., pertencente à família Malvaceae, é uma planta nativa da África, que tem sido incluída na dieta em várias partes do mundo (LENGSFELD et al., 2004). Segundo Ames, Macleod (1990), a utilização do quiabo remota desde o ano 1219 A.C. e acredita-se que teve sua expansão pelo mundo em meados de 1700.

Por ser de fácil cultivo em regiões tropicais e temperadas é amplamente distribuído na África, Ásia, Europa, Sul dos EUA e América do Sul (CALISIR et al., 2005). O quiabo passou a apresentar nos últimos anos grande importância comercial, com a expansão de cultivo em praticamente todas as áreas tropicais e subtropicais ao redor do mundo (OWOLARAFE; SHOTONDE, 2004; BENCHASRI, 2012).

De acordo com a FAO (2003), os maiores produtores de quiabo são a Índia, Paquistão, Gana, Egito e Nigéria. Esta hortaliça é especialmente valorizada na cultura alimentar e é empregada como terapêutico na medicina popular em várias partes da Nigéria (JARRET; WANG; LEVY, 2011). No Brasil, o quiabo foi introduzido com o comércio de escravos e se espalhou para todas as regiões do país, especialmente nas regiões Nordeste e Sudeste (EJECH; OJEATA; OYELEKE, 1997; JAIN et al., 2012).

O quiabo apresenta forma de cápsulas esverdeadas, com muitas sementes, alongadas e de coloração escura. Ainda imaturos são consumidos isoladamente ou em combinação com legumes em diferentes preparações (AGBO et al., 2008; KARAKOLTSIDIS; CONSTANTINIDES, 1975). O quiabo é conhecido por diferentes nomes ao redor do mundo, tais como: *abelmosco*, *guingombô*, *kingombó*, quiabeiro, quiabeiro-chifre-de-veado, quiabeiro comum, *okra*, além da sua denominação botânica antiga– *Hibiscus esculentus* L. (BENCHASRI, 2012; JAIN et al., 2012).

Além das vagens de quiabo, as sementes também são úteis para a alimentação, como fontes de óleo e proteínas, bem como terapêuticos de uso popular. Calsier et al. (2005), relatam que na Turquia as sementes maduras são torradas no solo e utilizadas como substituto do café; já Smit et al. (2013), reportaram que na medicina popular Turca, as sementes são empregadas no uso terapêutico do diabetes *mellitus* e na América Latina são utilizadas no tratamento para tumores. O óleo das sementes de quiabo também é comestível e representa uma fonte alternativa de lipídeos, sendo rico em ácidos graxos insaturados, como o ácido linoléico (AKINGBALA, 2003; AGBO, 2010). A farinha residual após a extração do óleo é significativamente rica em proteínas, representando 45% da composição nutricional das sementes, no entanto, em sua maioria, as sementes são utilizadas apenas para fins de plantio (MARTIN et al., 1979).

A maior parte da proteína e gordura das sementes de quiabo é acumulada no núcleo, enquanto a fibra bruta está concentrada na casca. As sementes possuem teores expressivos de proteínas de 20-30%, 14,01% de lipídeos (ácidos graxos insaturados de 16-18%), 30,81% de fibras totais, além de minerais como cálcio, ferro, magnésio, manganês e zinco (VWIOKO; OSAWARU; ERUOGUN, 2008; SOARES et al., 2012). O elevado teor de fibras, proteínas e

óleos justificam a importância da inclusão e utilização das sementes de quiabo na alimentação humana. Além disso, por serem fontes de substâncias bioativas, podem contribuir para a obtenção de novos produtos para utilização como matéria-prima para aplicações científicas, tecnológicas e comerciais (FOGLIO et al., 2006; BRANDÃO et al., 2010).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Proteômica Estrutural (LaProtE), Laboratório de Bioquímica, Genética e Radiobiologia (BioGeR) e Laboratório de Química de Alimentos (LAQA) da Universidade Federal da Paraíba (Campus I – João Pessoa-PB), em colaboração com o Centro de Química de Alimentos e Nutrição Aplicada (CCQA) do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL) e com o Departamento de Alimentos e Nutrição da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas FEA/UNICAMP, Campinas- SP. Para este estudo foram utilizadas sementes de quiabo (*A. esculentus*) obtidas do comércio local da cidade de João Pessoa/PB.

3.1 MATERIAL

A enzima Alcalase® 2.4L (produzida por *Bacillus licheniformis*) foi obtida comercialmente da Novozymes, North America Inc. (Franklinton, N.C., E.U.A.) A tricina da Sigma- Aldrich (St Louis, EUA), acrilamida e tris base da Bio-Rad (Hercules, CA, EUA). O reagente Comassie Brilliant Blue G250 foi adquirido da Merck (Hohenbrunn, Alemanha), bis-acrilamida da Amresco (Solon, Ohio, EUA). O dodecil sulfato de sódio (SDS), tris base, hidróxido de sódio, ácido clorídrico, tampão glicina e demais reagentes utilizados foram de grau analítico ou cromatográfico e os solventes orgânicos de alta pureza (P.A.).

3.2 OBTENÇÃO DO CONCENTRADO PROTEICO DE SEMENTES DE QUIABO

A farinha obtida a partir da trituração das sementes foi desengordurada com hexano P.A., com repetidas trocas do solvente em capela a cada 3 horas, durante 3 dias em temperatura ambiente (25°C). Após esse período o excesso de hexano foi retirado e filtrado, e a farinha deixada em temperatura ambiente até completa evaporação do solvente; obtendo-se, dessa forma, a farinha desengordurada de sementes de quiabo (FDSQ).

Para obtenção do concentrado proteico de sementes de quiabo (CPSQ), foi realizada a extração em meio alcalino, precipitação das proteínas no pI (ponto isoelétrico) e neutralização, conforme descrito por Dev; Quensel (1989), com ligeiras adaptações. A FDSQ foi dispersa em tampão glicina 0,1mol/L pH 9,0 na proporção 1:10 e a mistura foi mantida sobre agitação em agitador magnético da marca Solab, por 3 horas à temperatura ambiente

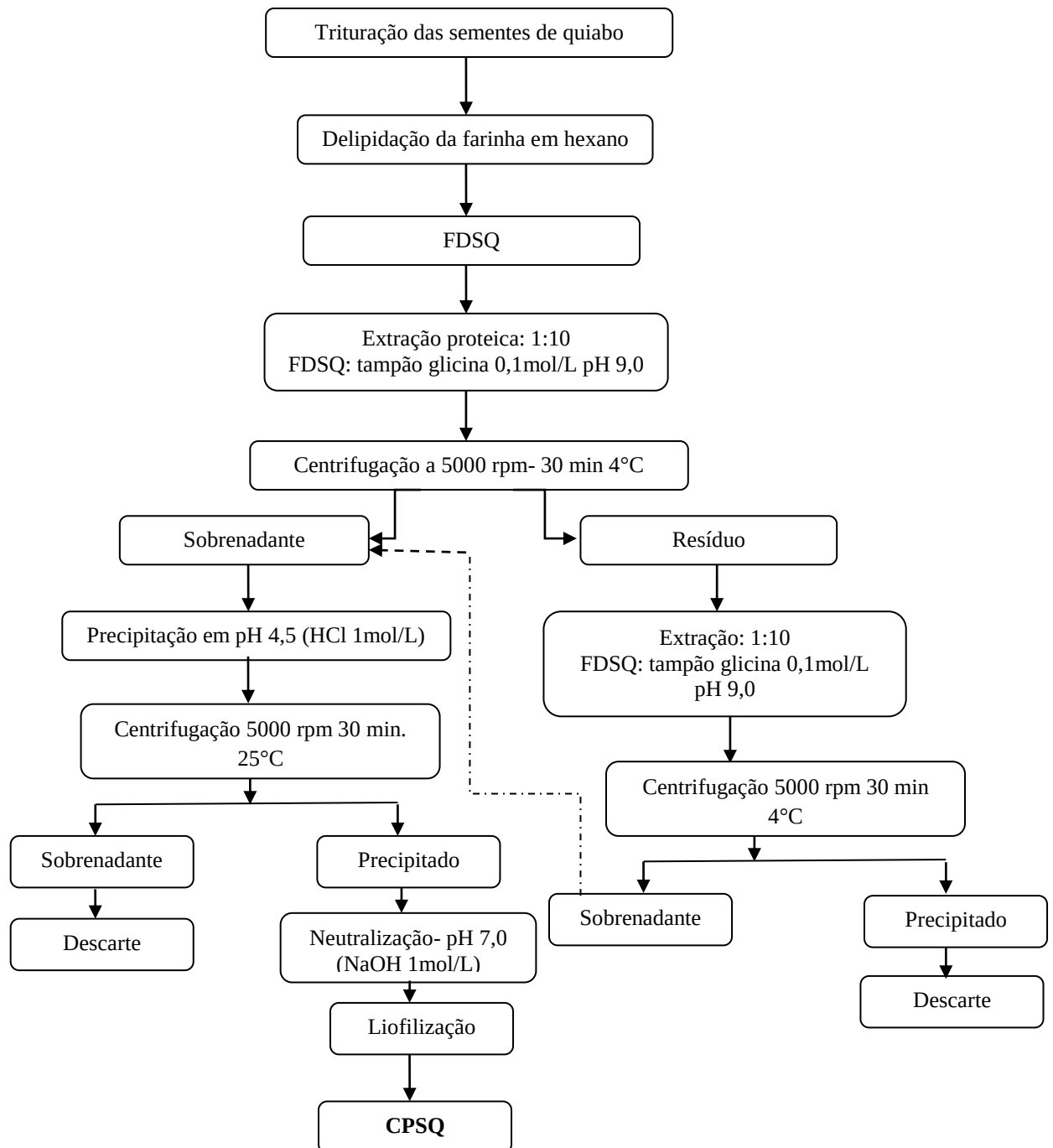
(25°C) e a suspensão obtida foi centrifugada a 5.000 rpm a 4°C por 30 minutos em centrífuga refrigerada Sigma® modelo 2K15.

O sobrenadante foi filtrado em papel de filtro e o precipitado foi utilizado para repetição do processo de extração das proteínas no mesmo tampão. O sobrenadante das duas extrações foi misturado e o pH ajustado para 4,5 pela adição de ácido clorídrico (HCl 1mol/L), essa mistura foi deixada em repouso por 30 minutos. A proteína precipitada foi separada por centrifugação a 5.000 rpm a 4°C por 30 minutos. Após centrifugação o precipitado foi ressuspensionado em pequeno volume de água ultrapura (tipo Mili-Q) e o pH ajustado para 7,0 pela adição de hidróxido de sódio (NaOH 1 mol/L). O precipitado foi dialisado em membrana de celulose da Sigma (6 kDa) contra água Milli-Q em agitação em temperatura de refrigeração (4°C), com trocas de água a cada 1 hora por 10 vezes para retirada do excesso de sódio da amostra.

Em seguida o precipitado, denominado CPSQ foi liofilizado em Liofilizador (modelo LS3000 Terroni). O CPSQ foi embalado a vácuo e estocado em temperatura de refrigeração para ser utilizado nas análises posteriores.

A Figura 2 ilustra o fluxograma das operações realizadas para a obtenção do concentrado proteico.

Figura 2: Fluxograma de obtenção do concentrado proteico de semente de quiabo (CPSQ).



Fonte: Adaptado de Silva (2012)

3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Neste estudo foi realizado experimento fatorial do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), com 2 fatores, 2 níveis, 3 pontos centrais e 4 pontos axiais, totalizando 11 ensaios para determinar as melhores condições de obtenção do hidrolisado proteico de sementes de quiabo (HPSQ). Nesses ensaios as variáveis independentes foram: concentração enzimática, que variou de 0,8 a 2,2%, e o tempo de hidrólise, com variação de 80 a 340 minutos (Tabelas 1 e 2). As variáveis dependentes foram o grau de hidrólise (GH), o rendimento da recuperação de proteína (RRP), a atividade antioxidante total (TAC) e a capacidade de eliminação dos radicais 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH) e 2,2'-azinobis- (3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid (ABTS). Utilizou-se o programa *Statistica®*, versão 5.0 (STATISTICA, 2004), e os resultados foram avaliados pelas superfícies de respostas geradas.

A protease escolhida para a hidrólise do CPSQ foi a Alcalase® por ser uma endopeptidase amplamente utilizada na produção de hidrolisados proteicos de origem vegetal (ZHU; ZHOU; QIAN, 2006). As condições de pH e temperatura foram fixadas de acordo com o pH ótimo para a atividade da enzima conforme o fabricante (pH 8,0) e a temperatura ótima (60°C) de acordo com De La Hoz et al. (2014).

Na Tabela 1 é mostrado os níveis reais e codificados do DCCR para a hidrólise do CPSQ com a utilização da enzima Alcalase®. A Tabela 2 mostra a matriz do DCCR para as variáveis independentes na hidrólise do CPSQ com a enzima Alcalase®.

Tabela 1: Níveis reais e codificados do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para a hidrólise do CPSQ a partir da enzima Alcalase®.

Níveis	$-\alpha$ (-1,41)	-1	0	+1	$+\alpha$ (+1,41)
Concentração enzimática (%)	0,8	1	1,5	2	2,2
Tempo (min)	80	120	210	300	340

$\alpha = (2^n)^{1/4} = 1,41$; onde n = n° de variáveis independentes.
Concentrado proteico de sementes de quiabo (CPSQ)

Tabela 2: Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para duas variáveis independentes na hidrólise do CPSQ a partir da enzima Alcalase®.

Ensaio	Valores Codificados		Valores Reais	
	Conc. Enzimática (%)	Tempo (min)	Conc. Enzimática (%)	Tempo (min)
1	-1	-1	1	120
2	+1	-1	2	120
3	-1	+1	1	300
4	+1	+1	2	300
5	0	0	1,5	210
6	0	0	1,5	210
7	0	0	1,5	210
8	-α	0	0,8	210
9	+α	0	2,2	210
10	0	-α	1,5	80
11	0	+α	1,5	340

Conc. enzimática- concentração enzimática (%)

Tempo (min.)- tempo em minutos

Concentrado proteico de sementes de quiabo (CPSQ)

3.4 OBTENÇÃO DOS HIDROLISADOS PROTEICOS DE SEMENTES DE QUIABO

Para o processo de hidrólise o CPSQ (8% m/v) foi dissolvido em água destilada e a solução colocada em béquer encamisado usando pH-stat com uso de titulador automático modelo DL 50 *Graphix* (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Suíça), acoplado ao banho termostatizado (Marconi, Piracicaba, Brasil), com sistema de agitação constante. O pH foi ajustado com NaOH 0,25mol/L até o pH ótimo para o ensaio. Durante a reação de hidrólise, o pH foi mantido constante através da adição de NaOH 0,25 mol/L e o consumo de base foi monitorado pelo equipamento.

A reação de hidrólise foi interrompida por aquecimento a 85 °C por 15 min. para a inativação da enzima. Após o final da reação, os hidrolisados assim obtidos foram centrifugados a 15.000 rpm/15 minutos em centrífuga modelo RC5C (Sorvall Instruments Dupont, Wilmington, EUA), e os hidrolisados obtidos foram congelados e liofilizados em Liofilizador Edwards - super Modulyo (West Sussex, RU). O grau de hidrólise (GH) foi definido pela Equação 1 (ADLER-NISSEN, 1986):

$$GH (\%) = B \times NB \times 1/\alpha \times 1/MP \times 1/htot \times 100 \text{ (Eq. 1)}$$

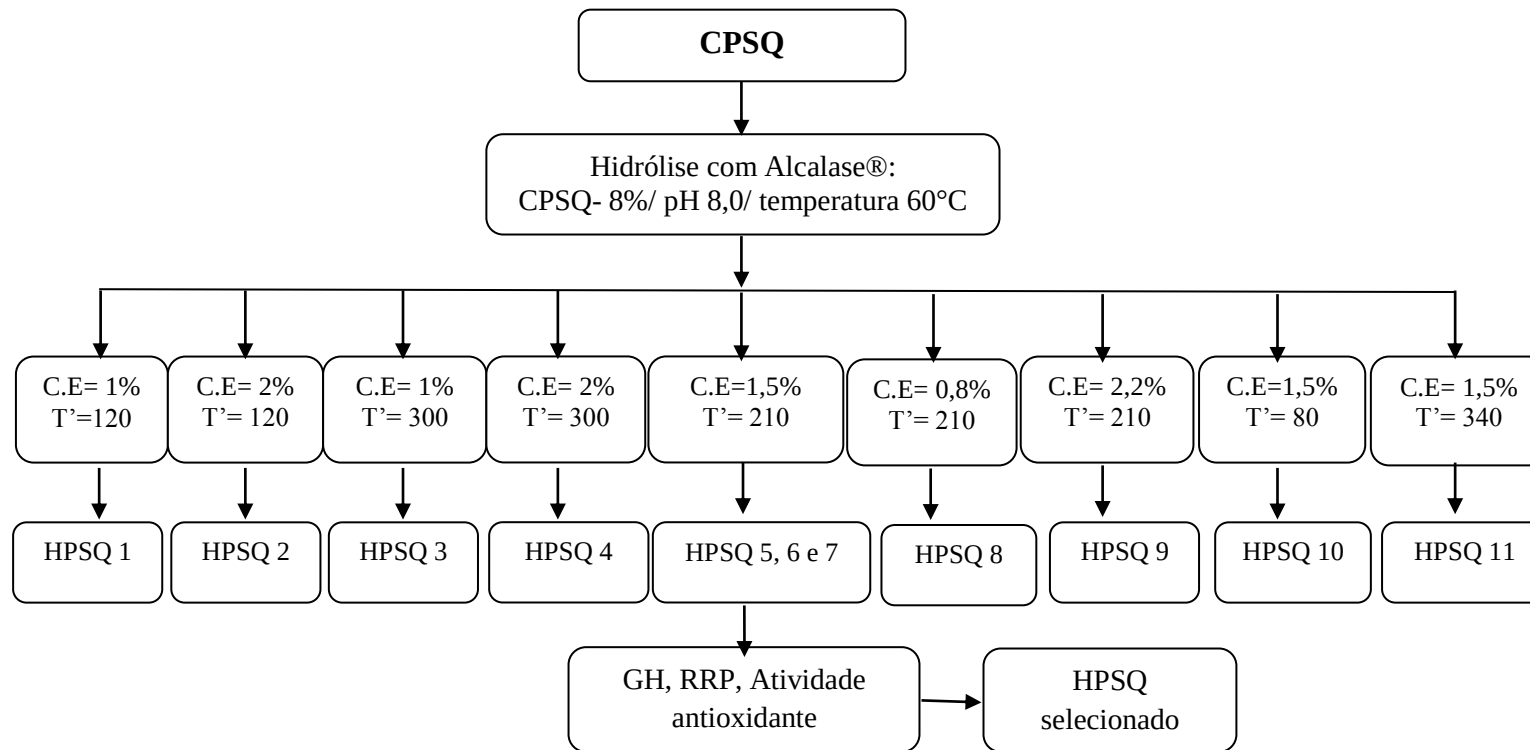
Onde: GH (%) = grau de hidrólise; B = consumo de base em mL; Nb = normalidade da base; $1/\alpha$ = média de grau de dissociação do grupo α -NH₂; MP = massa da proteína em g; htot = número total de ligações peptídicas no substrato proteico - 7,8 (proteína de soja), como referência de proteína vegetal (ADLER-NISSEN, 1986).

Para o rendimento da recuperação de proteína (RRP) dos hidrolisados, o teor de nitrogênio total dos hidrolisados foi determinado pelo método oficial de micro-Kjeldahl. O teor de proteína total foi calculado multiplicando-se o conteúdo de nitrogênio total pelo fator 5,75 (AOAC, 2010) e calculou-se o rendimento de recuperação de proteína a partir da Equação 2 (STADELMAN et al. 1988):

$$\% \text{ Rendimento} = \frac{\% \text{PTN Final}}{\% \text{PTN Inicial}} \times 100 \text{ (Eq.2)}$$

Na Figura 3 está ilustrado o fluxograma do processo de hidrólise do CPSQ para obtenção dos hidrolisados proteicos.

Figura 3: Fluxograma da obtenção de hidrolisados proteicos de sementes de quiabo (HPSQ) a partir do concentrado proteico de sementes de quiabo (CPSQ).



C.E.= concentração enzimática; T'= tempo em minutos/ Grau de hidrólise (GH)

Rendimento da recuperação de proteínas (RRP)

Fonte: Adaptado de Silva (2012)

3.5 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

3.5.1 Composição centesimal

A FSQI, FSQD, o CPSQ e HPSQ selecionado no DCCR, foram analisados quanto ao teor de proteína por Kjeldahl, cinzas e umidade, por gravimetria (AOAC, 2010); lipídeos pelo método de Bligh & Dyer (1959) e carboidratos por diferença. Na análise de Kjeldahl, para a conversão do nitrogênio total em proteína total, multiplicou-se o teor de nitrogênio pelo fator de conversão 5,75 (alimentos de origem vegetal). Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

3.5.2 Determinação de aminoácidos totais

A composição aminoacídica foi determinada segundo metodologia descrita por White, Hart e Kry (1986). O hidrolisado selecionado a partir do delineamento experimental e o CPSQ foram derivatizados em pré-coluna de aminoácidos liberados após a hidrólise ácida das proteínas (6 mol/L HCl), sob aquecimento (115 °C/22 h). A análise de aminoácidos foi realizada em cromatógrafo líquido (Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan) em coluna de fase reversa C18 - Luna - Phenomenex (250 mm x 4,6 mm, 5 µm; Phenomenex Inc., Torrence, CA, USA). A identificação dos aminoácidos foi realizada por comparação com padrão externo (Pierce, PN 20088) e para a quantificação foi utilizado o padrão interno ácido α -aminobutírico (Sigma-Aldrich®, St.Louis, MO, EUA), realizada conforme descrito por White, Hart e Kry (1986) e Hagen, Frost e Augustin (1989).

3.5.3 Determinação de aminoácidos livres

Os aminoácidos livres do hidrolisado (selecionado no DCCR), avaliado foram extraídos mediante a agitação orbital por 60 min, com ácido clorídrico 0,1 mol/L (g mL⁻¹) seguida de derivação em pré-coluna com fenilisotiocianato (PITC), de acordo com White, Hart e Fry (1986) e Hagen, Frost e Augustin (1989). A separação dos derivativos feniltiocarbamil-aminoácidos (PTC-aa) foi realizada em cromatógrafo líquido de alta resolução (Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan) em coluna de fase reversa C18 - Luna - Phenomenex (250 mm x 4,6 mm, 5 µm; Phenomenex Inc., Torrence, CA, USA).

As fases móveis empregadas consistiram de um tampão acetato pH 6,4 e uma solução de acetonitrila a 40 %. A injeção da amostra foi efetuada automaticamente (50 µL) e a detecção ocorreu a 254 nm. A separação cromatográfica foi realizada a um fluxo constante de 1 mL/min, à temperatura de 35 °C. O tempo de corrida cromatográfica foi de 45 minutos e os resultados foram expressos em mg de aminoácido por 100 g de amostra, em que a quantificação foi realizada mediante a adição do padrão interno ácido α -aminobutírico e identificação dos aminoácidos realizada por comparação a padrão externo (Pierce, PN 20088).

3.6 PERFIL ELETROFORÉTICO - SDS-PAGE-TRICINA

A eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de Tricina (SDS-PAGE/ Tricina) foi realizada para avaliar a hidrólise a partir do perfil eletroforético do CPSQ e dos hidrolisados, seguindo o método de Schagger; Jagow (1987). Para os perfis de distribuição de massa molecular do CPSQ e dos hidrolisados de 1 a 11 foram utilizados géis de poliacrilamida de diferentes concentrações: (14,6% T e 4% C), gel espaçador (10% T e 3% C) e gel de empilhamento (4% T e 3% C), em que T corresponde a somatória das percentagens de acrilamida e bisacrilamida em relação ao volume do gel, e C, a relação em peso entre a concentração de bisacrilamida e a soma das concentrações (%) de ambos os monômeros.

As amostras liofilizadas (10mg/mL) foram diluídas em tampão de amostra redutor (Tris-HCl 0,5M, pH 6,8, 10% SDS, 10% glicerol, 5% β -mercaptoetanol e 0,1%, azul de bromofenol) aquecidas a 90°C por 15 min. Após esse procedimento, as amostras foram aplicadas no gel e a corrida eletroforética foi desenvolvida a uma voltagem constante de 80V e 25 mA para cada placa, por aproximadamente 6 horas. Após a corrida, os géis foram fixados por 1 hora em solução metanol/ácido acético/ água (5:1:4) e corados por Comassie Brilliant Blue G250. Utilizou-se como padrão de baixa massa molecular marcador GE, com massas moleculares de 3,5- 38 kDa.

3.7 ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

3.7.1 Determinação da Capacidade antioxidante total (TAC)

A atividade antioxidante total foi determinada pelo método do fosfomolibdênio, de acordo com Prieto, Pineda, Aguilar (1999), com ligeiras modificações. Alíquotas de 0,1 mL do CPQ e dos hidrolisados de 1 a 11 (10 mg/mL) foram dissolvidas em água destilada com 1

mL da solução reagente (ácido sulfúrico 600 mmol/L, fosfato de sódio 28 mmol/L e molibdato de amônio 4 mmol/L), o ácido ascórbico (125µl), foi utilizado como controle positivo e para o controle negativo utilizou-se água destilada e solução reagente, as análises foram realizadas em triplicata. Os tubos foram incubados a 95 °C por 90 min, após resfriamento, à temperatura ambiente, foi determinada a absorbância a 695 nm. A atividade antioxidante total foi expressa em relação ao ácido ascórbico e calculada pela Equação 3:

$$\% \text{ TAC} = (\text{As} - \text{Ac}) \times 100 / (\text{Aaa} - \text{Ac}) \quad (\text{Eq.3})$$

Onde Ac é a absorbância do controle (ausência de amostra), As é a absorbância na presença da amostra e Aaa é a absorbância do ácido ascórbico.

3.7.2 Determinação da Capacidade sequestrante do radical DPPH

A capacidade sequestrante do radical 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH), pelo CPSQ e hidrolisados foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Morales; Jiminez-Perez (2001), com ligeiras modificações. Alíquotas de 60µl de amostra (10 mg/mL) diluídas em água destilada foram misturadas a 1,5 mL de solução de DPPH (60 µmol/L) diluído em etanol P.A. A mistura foi agitada durante 85 min, à temperatura ambiente (20-23 °C) e na ausência de luz, em seguida, a amostra foi centrifugada a 14.500 rpm durante 5 min (centrífuga Sigma® 2K15) e a absorbância do sobrenadante foi mensurada a 517 nm. A concentração do radical DPPH nas amostras de reação foi calculada a partir de uma curva de calibração, usando Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), um antioxidante sintético análogo à vitamina E, (1.000 µmol/L), para construção da curva padrão. A atividade sequestrante das amostras foi expressa como a percentagem do efeito do Trolox sobre o radical livre na Equação 4:

$$\% \text{ Efeito sequestrante} = [(\text{Abs branco} - \text{Abs amostra}) / \text{Abs branco}] \times 100 \quad (\text{Eq.4})$$

Adicionalmente, o coeficiente de capacidade antioxidante equivalente de Trolox (TEAC) foi calculado dividindo a concentração de Trolox pela curva e a concentração final da amostra em mg/mL.

3.7.3 Determinação da Capacidade de eliminação do radical ABTS

A capacidade sequestrante do radical 2,2'-azinobis- (3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid (ABTS•+), pelo CPSQ e hidrolisados foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Wiriyaphan; Chitsomboon; Yongsawadigul (2012). Uma solução estoque de ABTS•+ foi preparada, por mistura da solução de ABTS•+ (7 µmol/L) e persulfato de potássio (140 µmol/L) e mantida ao abrigo da luz durante 16 h. A solução de trabalho foi elaborada diluindo a solução estoque em etanol P.A. para atingir a absorbância de $0,7 \pm 0,05$ em 734 nm. , usando Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), um antioxidante sintético análogo à vitamina E, (1.000 µmol/L), para construção da curva padrão. Aliquota de 20 µL de amostra (10 mg/mL) foi misturada com 3,0 mL da solução do radical ABTS•+ em tubos de ensaio e homogeneizadas em agitador de tubos. Após 6 min a leitura foi realizada a (734 nm). A capacidade de eliminação do radical ABTS•+ foi calculada de acordo com a Equação 5:

Capacidade de eliminação de radicais ABTS (%) = $[(\text{Abs branco} - \text{Abs amostra} / \text{Abs do branco}) \times 100]$ (Eq.5)

O coeficiente de capacidade antioxidante equivalente de Trolox (TEAC) foi calculado dividindo a concentração de Trolox pela curva e a concentração final da amostra em mg/mL.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados deste estudo foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA) utilizando o software *Statistica* 5.0 (STATISTICA, 2004). As médias foram comparadas utilizando-se o teste de Scott Knott a um nível de significância de 5%.

REFERÊNCIAS

- ADLER-NISSEN, J. **Enzymic hydrolysis of food protein**. London: Elsevier Applied Science Publishers, 1986.
- ADLER-NISSEN, J. Proteases. In: NAGODAWITHANA, T. e REED, G. (Ed.). **Enzymes in Food Processing**. 3 ed. San Diego, California: Academic Press, Inc., cap. 7, p.159-203. 1993.
- AGBO, E.A.; NEMLIN, J.G.; ANVOH, B.K.; GNAKRI, D. Characterisation of lipids in okra mature seeds. **International Journal of Biological and Chemical Sciences**. v. 4, n. 1, p. 184-192, 2010.
- ALUKO, R. E.; MONU, E. Functional and Bioactive Properties of Quinoa Seed Protein Hydrolysates. **Journal Food Scienc**. v. 68, n. 4, 2003.
- AMES, J. M.; MACLEOD, G. Volatile components of okra. **Phytochemistry**, v. 29, p. 1201-1207, 1990.
- AOAC International. Official Methods of Analysis of AOAC.International. 18ed. 3a rev. Gaithersburg, MD, USA, 2010.
- ARCAN, I.; YEMENICIOGLU, A. Effects of controlled pepsin hydrolysis on antioxidant potential and fractional changes of chickpea proteins. **Food Research International**, v. 43, n. 1, p. 140-147, 2010.
- ARUOMA, O.I.; NEERGHEEN, V.S.; BAHORUN, T., JEN, L-S. Free radicals, antioxidants and diabetes: embryopathy, retinopathy, neuropathy, nephropathy and cardiovascular complications. **Neuroembryol Aging**. v.4, p. 117-137, 2007.
- AKINGBALA, J.O., AKINWANDE, B.A., UZO-PETERS, P.I., Effects of colour and flavour. changes on acceptability of ogi supplemented with okra seed meals. **Plant Foods for Human Nutrition**. v.58, p. 1–9, 2003.
- BALLINGER, S.W. Mitochondrial dysfunction in cardiovascular disease. **Free Radical Biology Medicine** v.38, p. 1278-1295, 2005.
- BARETT, A.J. Proteolytic enzymes: serine and cysteine peptidases. **Methods Enzymol**. v.244, p.1-15, 1994.
- BENCHASRI, S. Okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench) as a Valuable Vegetable of the World Ratar. **Ratarstvo i povrtarstvo**, v. 49, p. 105-112, 2012.
- BERGMANN, M. A. classification of proteolytic enzymes. In: (Ed.). **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**: John Wiley & Sons, Inc., p.49-68. 2006.
- BEYNON, R.; BOND, J.S. **Proteolytic Enzymes**. 2. ed. Oxford: Oxford University Press, 2001. 340 p.

BLIGH E.G.; DYER W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, p. 911–917, 1959.

BRANDÃO, M. G. L.; PAUSA-SOUZA, J.; GRAEL, C. F. F.; SCALON, V.; SANTOS, A. C. P.; SALIMENHA, M. F.; MONTE-MOR, R. L. M. Biodiversidade, uso tradicional de plantas medicinais e produção de fitoterápicos em Minas Gerais. **In:** Seminário sobre a economia mineira, XIV., 2010, Minas Gerais. *Anais...XIV Seminário sobre a Economia Mineira [Proceedings of the 14th Seminar on the Economy of Minas Gerais]*.

CALISIR S.; ÖZCAN M.; HACISEFEROĞULLARI H.; YILDIZ U.M. A Study on some physic-chemical properties of Turkey okra (*Hibiscus esculenta* L.) seeds. **Journal of Food Engineering**, v. 68, p.73–78, 2005.

CHALAMAIAH, M. ; KUMAR, B.D.; HEMALATHA, R.; JYOTHIRMAY, T. Fish protein hydrolysates: proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: a review. **Food chemistry**, v. 135, n. 4, p. 3020–38, 15 dez. 2012.

CHEN, C.; CHI, Y.-J.; ZHAO, M.-Y.; LV, L. Purification and identification of antioxidant peptides from egg white protein hydrolysate. **Amino Acids**, v. 43, p. 457–466, 2012.

CHERUBINI, A.; RUGGIERO, C.; POLIDORI, M.C; MECOCCHI, P. Potential markers of oxidative stress in stroke. **Free Radical Biology Medicine** v. 39, p. 841-852, 2005.

CLEMENTE, A., “Enzymatic Protein Hydrolysates in Human Nutrition”, **Trends in Food Science& Technology**, v 11, p 254-262, 2000.

COMHAIR, S.A.A.; ERZURUM, S.C. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v.283, p. L246-L255, 2002.

CONTRERAS, M. D. M.; HENÁNDEZ-LEDESMA, B.; AMIGO, L.; MARTÍN-ÁLVAREZ, P.J. Production of antioxidant hydrolyzates from a whey protein concentrate with thermolysin: Optimization by response surface methodology. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 1, p. 9–15, jan. 2011.

COZZOLINO, F.; LECCE, L.; FRISULLO, P.; CONTE, A.; NOBILE, M.A.D. Functional food: product development and health benefits. **Recent Patents on Engineering**, v. 6, n. 1, p. 2-19, 2012.

DE LA HOZ, L. ; SILVA, V.S.N.; MORGANO, M.A.; PACHECO, M.T.B. Small peptides from enzymatic whey hydrolyzates increase dialyzable iron. **International Dairy Journal**. v. 38, p 145- 147, 2014.

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

DEV, D. K.; QUENSEL, E. Functional Properties of Linseed Protein Products Containing Different Levels of Mucilage in Selected Food Systems. **Journal of Food Science**, v. 54, n. 1, p. 183-186, 1989.

DINIZ, F.M.; MARTIN, A.M. Hidrolisado protéico de pescado In: OGAWA, M. & MAIA, E.L. **Manual de Pesca**. São Paulo: Varela, 1999.

DIPLOCK, A. T.; AGGETT, P. J.; ASHWELL, M. et al. Scientific concepts of functional foods in Europe: Concensus document. **British Journal of Nutrition**, v. 81, n. 4, p. S1-S27, 1999.

DURACKOVÁ, Z. Some current insights into oxidative stress. **Physiological Research**, v. 59, p. 459-469, 2010.

EJECHI, O.; OJEATA, A.; OYELEKE, S. B. The effect of extracts of some Nigerian spices on biodeterioration of Okro (*Abelmoschus* (L) Moench) by fungi. **Journal of Phytopathology**, vol. 145, p.469-472, 1997.

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

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

ESPEJO-CARPIO, F. J.; DE GOBBA, C.; GUADIX, A.; GUADIX, E.M.; OTTE, J. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of enzymatic hydrolysates of goat milk protein fractions. **International Dairy Journal**, v. 32, p. 175-783, 2013.

ESTEVE, C.; MARINA, M.L.; GARCÍA, M.C. Novel strategy for the revalorization of olive (*Olea europaea*) residues based on the extraction of bioactive peptides. **Food Chemistry**, 167, 272–280, 2015.

FAO, 2003. FaoStat Database. Available from: <http://faostat.fao.org> (acesso em 10.01.15).

FDA. Listing of food additive status part II, 2011. <<http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/FoodAdditives/ucm191033.htm>> (acesso 15.02.2014).

FIELDS F., FALLA T.J., RODAN K., BUSH L. Bioactive peptides: signaling the future. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v.8, p.8–13, 2009.

FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUSA, I. M. O.; RODRIGUES, A. F. Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: Um modelo multidisciplinar. **Revista Interdisciplinar dos Centros e Núcleos da Unicamp**, vol. 7, Outubro de 2006.

FRITZ, M., VECCHI, B., RINALDI, G., AÑÓN, M. C. Amaranth seed protein hydrolysates have in vivo and in vitro antihypertensive activity. **Food Chemistry**, v.126, p. 878–884, 2011.

GARCÍA, M. C.; PUCHALSKA, P.; ESTEVE, C.; MARINA, M.L. Vegetable foods: a cheap source of proteins and peptides with antihypertensive, antioxidant, and other less occurrence bioactivities. **Talanta**, v. 106, p. 328–49, 15 mar. 2013.

GHAFFARI, S. Oxidative stress in the regulation of normal and neoplastic hematopoiesis. **Antioxid Redox Signal** v.10, p. 1923-1940, 2008.

GIORDANO, R. L. C. **Estudo cinético da hidrólise enzimática de amido: inibição pelo produto**. 1987. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) -Escola Politécnica, USP, São Paulo. 203p. 1987.

HAGEN, S. R., FROST, B., AUGUSTIN, J. Pre-column phenylisothiocyanate derivatization and liquid chromatography of amino acids in food. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 72, p.912- 916, 1989.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Lipid peroxidation: a radical chain reaction. **Free Radical in Biology an Medicine**. New York: Oxford University, p.189- 276, 1999.

HAQUE, Z. U.; MOZAFFAR, Z. Casein hydrolysate. II. Functional properties of peptides. **Food Hydrocolloids**, v. 5, n. 6, p. 559-571, 1992.

HARTMANN, R.; MEISEL, H. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. **Current Opinion in Biotechnology**, Elsevier, v. 18, p. 163-169. 2007.

HOYLE, N. T.; MERRIT, J. N. Quality of Fish Protein Hydrolysates from Herring (*Clupea harengus*). **Journal of Food Science**, v.59, n.1, p.76-79, 1994.

JAMDAR, S. N.; RAJALAKHMI, V.; PEDNEKAR, M.D.; JUAN, F.; YARDI, V.;

SHARMA, A. Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate. **Food Chemistry**, v. 121, n. 1, p. 178–184, jul. 2010.

JAIN, N.; JAIN, R.; JAIN, V.; JAIN, S. A review on: *Abelmoschus esculentus*. **Pharmacia**, v. 1, n. 3,p. 84-89, 2012.

JARRET, R.L., WANG, M.L., LEVY, I.J. Seed oil and fatty acid content in okra (*Abelmoschus esculentus*) and related species. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, p. 4019–4024, 2011.

KARAKOLTSIDIS, P. A; CONSTANTINIDES, S. M. Okra Seeds: A New Protein Source. **Journal of agricultural and food chemistry**. v. 23, p. 6, 1975.

KIM, S. B.; SEO, I. S.; KHAN, M. A. et al. Enzymatic hydrolysis of heated whey: iron-binding ability of peptides and antigenic protein fractions. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 9, p. 4033-4042, 2007.

KIM, S.; PARK, P.; RHEE, K. Functional properties of proteolytic enzyme modified soy protein isolate. **Journal of agricultural and food chemistry**, ACS Publications, 38, 651-656, 1990.

KLAUNIG JE, KAMENDULIS LM. The role of oxidative stress in carcinogenesis. **Annu Review of Pharmacology Toxicol**, v. 44, p.239-267, 2004.

KRISTINSSON, H. G.; RASCO, B. A. Fish protein hydrolysates: production, biochemical and functional properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 40, n. 1, p. 43-81, 2000.

LEE, J.; LEE, H.D.; LEE, C. Characterization of hidrolysates produced by mild-acid treatment and enzymatic hydrolysis of defatted soybean flour. **Food Research International**. v. 34, n. 2-3, p. 217-222, mar., 2000.

LENGSFELD, C.; TITGEMEYER, F.; FALLER, G.; HENSEL, A. Glycosylated compounds from okra inhibit adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric mucosa. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 52, p. 1495-1503, 2004.

LENINGHER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. 2ª edição. São Paulo: Sarvier, 1995.

LI-CHAN, E. V.Y. Bioactive Peptides And Protein Hydrolysates: Research Trends And Challenges For Application As Nutraceuticals And Functional Food Ingredients. **Current Opinion In Food Science**, v. 1, p. 28–37, 2015.

LIMÓN-PACHECO, J.; GONSEBATT, M. E. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 674, n. 1-2, p. 137-147, 2009.

LIU, RH; FINLEY, J. Modelos de cultura celular potencial de investigação antioxidante. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4311-4314, 2005.

MARTIN, F. W.; TELEK, L; RUBERTE, R.; SANTIAGO, A. G . Protein, Oil and Gossypol Contents of a Vegetable Curd Made from Okra Seeds, **Journal of Food Science**, v. 44 n.5, 1517–1519, 1979.

MARTÍNEZ-CAYUELA, M. Oxygen free radicals and human disease. **Biochimie**, v. 77, n. 3, p. 147-161, 1995.

MATSUDA, M., SHIMOMURA, I. Increased oxidative stress in obesity: Implications for metabolic syndrome, diabetes, hypertension, dyslipidemia, atherosclerosis, and cancer. **Obesity Research and Clinical Practice**, v. 7, p. e330–e341, 2013.

MEGÍAS, C.; PEDROCHE, J.; YUST, M.D.M.; ALAIZ, M.; GIRÓN-CALLE, J.; MILLÁN, F.; VIOQUE, J. Stability of sunflower protein hydrolysates in simulated gastric and intestinal fluids and Caco-2 cell extracts. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, n. 9, p. 1496–1500, nov. 2009.

MEGÍAS, C.; PEDROCHE, J.; YUST, M.M.; GIRÓN-CALLE, J.; ALAIZ, M.; MILLÁN, F.; VIOQUE, J. Production of copper-chelating peptides after hydrolysis of sunflower proteins with pepsin and pancreatin. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, n. 10, p. 1973–1977, dez. 2008.

MINE, Y.; LI-CHAN, E.; JIANG, B. (Eds.), **Bioactive Proteins and Peptides as Functional Foods and Nutraceuticals**, Wiley-Blackwell, 2010.

MINKIEWICZ P, DZIUBA J, IWANIAK A, DZIUBA M, DAREWICZ M: BIOPEP database and other programs for processing bioactive peptide sequences. **Journal of AOAC International**, v. 91, p. 965-980, 2008.

MOLLER, N. P.; SCHOLZ-AHRENS, K, E.; ROOS, N.; SCHREZENMEIR, J. Bioactive peptides and proteins from foods: Indication for health effects. **Europe an Journal of Nutrition**, p. 47, v.171-182, 2008.

MORALES, F.J.; JIMENEZ-PEREZ, S. Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to colour and fluorescence. **Food Chemistry**, v. 72, p. 119–125, 2001.

MUCHOVÁ J, LIPTÁKOVÁ A, ORSZÁGHOVÁ Z, GARAIOVÁ I, TISOŇ P, ČÁRSKY J, ĎURAČKOVÁ Z: Antioxidant systems in polymorphonuclear leukocytes of type 2 diabetes mellitus. **Diabetic Medicine** v. 16, p. 74-78, 1999.

NAGAI T., SUZUKI N., TANOUE Y., KAI N., NAGASHIMA T. Antioxidant and antihypertensive activities of autolysate and enzymatic hydrolysates from yam (*Dioscorea opposita* Thunb.) ichyoimo tubers. **Journal of Food Agricultura and Environment**. v.5:, p. 64–8, 2007.

NCHIENZIA, H. A.; MORAWICKI, R. O.; GADANG, V. P. Enzymatic hydrolysis of poultry meal with endo- and exopeptidases. **Poultry Science**, v. 89, n. 10, p. 2273-2280, 2010.

NG, K. L.; AYOB, M.K.; SAID, M.; OSMAN, M.A.; ISMAIL, A. Optimization of enzymatic hydrolysis of palm kernel cake protein (PKCP) for producing hydrolysates with antiradical capacity. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 725–731, maio 2013.

OWOLARAFE, O. K.; SHOTONDE, H. O. Some physical properties of fresh okro fruit. **Journal of Food Engineering**, v. 63, p. 299-302, 2004.

PARK, Y. K. Produção de enzimas industriais de origem animal. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E., *et al* (Ed.). **Biotechnologia Industrial**. 1 ed. São Paulo, Brasil: Edgard Blücher, v.3, cap. 15, p.363-366. 2001.

PECHÁŇ I., DAŇOVÁ K., OLEJÁROVÁ I., HALČÁK L., RENDEKOVÁ V., FABIÁN J. Oxidative stress and antioxidante defense systems in patients after heart transplantation. **Wien Klin Wochenschr** 115, 648-651, 2003.

PEDROCHE, J., YUST, M. M., MEGÍAS, C., LQARI, H., ALÁIZ, M., GIRÓN-CALLE, J., , MILLÁN, F., VIOQUE. J.Utilisation of rapeseed protein isolates for production of peptides with angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity. **Grasas y Aceites**, v.55, p.354–358, 2004.

PERCZEL, A., HUDAKY, P., CSIZMADIA, IG. Fatores que determinam a superfície Ramachandran de peptídeos Decifrando. A aplicação de superfícies isodésmicas, $AE_{ID}(\varphi, \psi)$,

para analisar a contribuição de porções rotativos com a forma de superfícies de energia potencial. **Journal of Molecular Structure** (Theochem), 500, p. 59-96, 2000.

PRIETO, P., PINEDA, M., AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v.269, p. 337-341, 1999.

RAHMAN, I. Oxidative stress, chromatin remodeling and gene transcription in inflammation and chronic lung diseases. **journal of biochemistry and molecular biology**, v. 36, p. 95-109, 2003.

RAO M.B.; APARNA,M.T.; GHATGE, M.S.; DESHPANDE, V.V. Molecular and Biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. 62: 597-635, 1998.

SAID, S.; PIETRO, R. **Enzimas de Interesse Industrial e Biotecnológico**, Eventos Ed., 122 p, 2002.

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

SAMARANAYAKA, A. G. P.; LI-CHAN, E. C. Y. Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. **Journal of Functional Foods**, v. 3, n. 4, p. 229–254, out. 2011.

SATHIVEL, S., SMILEY, S., PRINYAWIWATKUL, W., BECHTEL, P. J. Functional and nutritional properties of red salmon (*Oncorhynchus nerka*) enzymatic hydrolysates. **Journal of Food Science**, v. 70, p. 401–406, 2005.

SCHÄGGER, H.; JAGOW, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Analytical Biochemistry**, n. 166, p. 368-379, 1987.

SCHAAFSMA, G. Safety of protein hydrolysates, fractions there of and bioactive peptides in human nutrition. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 1, p. 8, 2009.

SEGURA-CAMPOS, M. R.; SALAZAR-VEJA, M.I.; CHEL-GUERRERO, L.A.; BETANCUR-ANCONA, D.A. Biological potential of chia (*Salvia hispanica* L.) protein hydrolysates and their incorporation into functional foods. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, n. 2, p. 723–731, mar. 2013.

SHAHIDI, F.; HAN, X. Q.; SYNOWIECKI, J. Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). **Food Chemistry**, v. 53, n. 3, p. 285-293, 1995.

SILVA, G.D.S. **Atividade Antioxidante De Produtos Proteicos De Linhaça (*Linum Usitatissimum* L.)** 2012. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) –Faculdade de Engenharia de alimentos. UNICAMP, Campinas, S.P. 96p. 2012.

SILVA-SÁNCHEZ, C., DE LA ROSA, A. P. B., LEÓN-GALVÁN, M. F., DE LUMEN, B. O., DE LEÓN- RODRÍGUEZ, A., DE MEJÍA, E. G. Bioactive peptides in amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seed. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 56, 1233–1240, 2008

SILVA, F. G. D.; O'CALLAGAHAN, Y.; O'BRIEN, N. M.; NETTO, F. M. Antioxidant Capacity of Flaxseed Products: The Effect of In vitro Digestion. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 68, n.1, p. 24-30, 2012.

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

SLIZYTE, R.; DAUKSAS, E.; FALCH, E.; STORRO, I.; RUSTAD, T.; **Process Biochem.** v. 40, p. 1424, 2005.

SMIT, R., NEERAJ, K., PREETI, K. Traditional Medicinal Plants Used for the Treatment of Diabetes, **International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research**, v. 3, n.3, p. 171-175, 2013.

SOARES, G.D.F., GOMES, V.D., ALBUQUERQUE, A.D. , DANTAS, M.B., ROSENHAIN, R., SOUZA, A.G., PERSUNH, D.C. , GADELHA, C.A.D., COSTA, M.J.D., GADELHA, T.S. Spectroscopic and thermooxidative analysis of organic okra oil and seeds from *Abelmoschus esculentus*. **Science World Journal**, p. 3–8, 2012.

STATISTICA. **Statistica for Windows Software**. v. 5.0, Tulsa, OK, USA, 2004.

STARCEVIC, S. L.; DIOTTE, N. M.; ZUKOWSKI, K. L.; CAMERON, M. J.; NOVAK, R. F. Oxidative DNA Damage and repair in a cell lineage model of human proliferative breast disease (PBD). **Toxicological Science**, v. 75, p. 74-81, 2003.

STADELMAN, W. J.; OLSON, V. M.; SHEMWELL, G. A. PASCH, S. Egg and Poultry-Meat Processing. Ellis and Horwood, **Chichester**, UK, 1988.

SUKAN, G.; ANDREWS, A.T. Application to the plastein reaction to casein and skim-milk powder. **Journal of Dairy Research**, v. 49, p. 265-78, 1982.

TIDONA, F.; CRISCIONE, A.; JACOBSEN, M.; BORDONARO, S; VEGARUD, G.E.; MARLETTA, D. Antimicrobial effect of donkeys' milk digested in vitro with human gastrointestinal enzymes. **International Dairy Journal**, v. 21, p. 158-165, 2011.

TSOU, M.J. Enhancing the anti-adipogenic activity of siy protein by limited hydrolysis with Flavourzyme and ultrafiltration. **Food Chemistry**, Yuanlin Changhua, v. 122, n-1, p.243-248, 2010.

UDENIGWE, C. C.;ALUKO, R. E. Food protein-derived bioactive peptides: production, processing, and potential health benefits. **Journal of Food Science**, 77, R11eR24, 2012.

VALDEZ-ORTIZ, A.; FUENTES-GUTIÉRREZ, C.I. ; GERMÁN-BÁEZ, L.J. ; GUTIÉRREZ-DORADO, R. ; MEDINA-GODOY, R. Protein hydrolysates obtained from Azufrado (sulphur yellow) beans (*Phaseolus vulgaris*): Nutritional, ACE-inhibitory and

antioxidative characterization. **LWT - Food Science and Technology**. México, 46, 91-96, 2012.

VALKO M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.39, p.44-84, 2007.

VALTUEÑA, S.; PELLEGRINI, N.; FRANZINI, L.; BIANCHI, M. A.; ARDIGÒ, D. et al. Food selection based on total antioxidant capacity can modify antioxidant intake, systemic inflammation, and liver function without altering markers of oxidative stress. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 87, n. 5, p. 1290-1297, 2008.

VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, n. 1, p. 1-40, 2006.

VERMEIRSEN V.; CAMP J.V.; VERSTRAETE, W. Bioavailability of angiotensin I converting enzyme: inhibitory peptides. **British Journal of Nutrition**. v. 92, p. 357–66, 2004.

VIOQUE J.; CLEMENTE A.; PEDROCHE J.; YUST M.M.; MILLAN F. Obtencion y aplicaciones de hidrolizados proteicos. **Grasas Aceites**, v. 52, p.132–6, 2001.

VWIOKO, E. D.; OSAWARU, M. E.; ERUOGUN, O, L. Nickel and chromium concentrations in plant tissues of accessions of Okro (*Abelmoschus esculentus* (L) Moench.) grown in soil contaminated with paint waste. **African Journal of General Agriculture**, v. 4, n. 1, p.27-37, 2008.

WANG, Q.-K, LI, W., HE, wangY.-H., REN, D.-D., KOW, F., SONG, L.-L., YU. X.-J. Novel antioxidative peptides from the protein hydrolysate of oysters (*Crassostrea talienwhanensis*) **Food Chemistry**, v.145, p. 991–996, 2014.

WHITAKER, J.R. **Principles of enzymology for the food sciences**. 2ª edição. New York: Marcel Dekker Inc., 1994.

WICKENS, A. P. Ageing and the free radical theory. **Respiration Physiology**, v. 128, n. 3, p. 379-391, 2001.

WIRIYAPHAN, C.; CHITSOMBOON, B.; YONGSAWADIGUL, J. Antioxidant activity of protein hydrolysates derived from threadfin bream surimi byproducts. **Food Chemistry**, v. 132, n. 1, p. 104–111, maio 2012.

WHITE, J. A.; HART, R. J.; FRY, J. C. An evaluation of the Waters Pico-Tag system for the amino-acid analysis of food materials. **Journal of Automatic Chemistry**, v. 8, p. 170-177, 1986.

WU, J.; DING, X. Characterization of inhibition and stability of soy-protein-derived angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides. **Food Research International**, Elsevier, 35, 367-375, 2002.

YANG, B.; YANG, H.; LI, J.; LI, Z.; JIANG, Y. Amino acid composition, molecular weight distribution and antioxidant activity of protein hydrolysates of soy sauce lees. **Food Chemistry**, v. 124, n. 2, p. 551–555, jan. 2011.

YAMAMOTO, A. Proteolytic enzymes. In: REED, G. (Ed.). **Enzymes in Food Processing**. 2 ed. London: Academic Press, p.123-179. 1975.

YUST, M. M.; PEDROCHE, J.; MEGÍAS, C.; GIRÓN-CALLE, J.; ALÁIZ, M.; MILLÁN, F. Rapeseed protein hydrolysate: A source of HIV protease peptide inhibitors. **Food Chemistry**, v.87, p.387–392, 2004.

ZHANG T.; LI Y.; MIAO M.; JIANG B. Purification and characterisation of a new antioxidant peptide from chickpea (*Cicer arietium* L.) protein hydrolysates. **Food Chemistry**. v. 128, p. 28-33, 2011.

ZHU, K.; ZHOU, H.; QIAN, H. Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 6, p. 1296-1302, 2006.

ZHU, L.; CHEN, J.; TANG, X.; XIONG, Y. L. Reducing, Radical Scavenging, and Chelation Properties of in Vitro Digests of Alcalase-Treated Zein Hydrolysate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 8, p. 2714-2721, 2008.

ZHUANG, H.; TANG, N.; YUAN, Y. Purification and identification of antioxidant peptides from corn gluten meal. **Journal of Functional Foods**, v. 5, p. 1810–1821, 2013.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados desta pesquisa estão apresentados sob a forma de artigos científicos nas normas da Revista Científica Food Chemistry, com Qualis A1 e Fator de impacto 3.259.

Artigo I- Optimizing the enzymatic hydrolysis of the okra (*Abelmoschus esculentus* L. Moench) seed proteins in the production of a hydrolysed compound with antioxidant properties. Submetido ao periódico Food Chemistry, manuscrito de número: S-15-01688.

Artigo II- Hidrolisado proteico de sementes de quiabo (*Abelmoschus esculentus* L. Moench): composição centesimal, aminoacídica, capacidade antioxidante e perfil eletroforético.

ARTIGO I

Optimizing the enzymatic hydrolysis of the okra (*Abelmoschus esculentus* L. Moench) seed proteins in the production of a hydrolysed compound with antioxidant properties

Edilza Silva do Nascimento^a, Sandro Mascena Gomes Filho, Rodrigo Rodrigues e Lacerda^a, Samara Batista Montenegro^a, Flávio Luiz Honorato da Silva^b, Marta Suely Madruga^b, Maria Teresa Bertoldo Pacheco^c, Tatiane Santi Gadelha^a, Carlos Alberto de Almeida Gadelha^{a,*}

^a Laboratório de Proteômica Estrutural, Departamento de Biologia Molecular, Universidade Federal da Paraíba, Cidade Universitária, João Pessoa, PB CEP 58059-900, Brazil

^b Instituto de Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos. Campinas, SP. CEP 13070178. Brazil

^c Laboratório de Análise Química dos Alimentos, Centro de Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba. Cidade Universitária, João Pessoa, PB CEP 58051-970, Brazil

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: calbgadelha@gmail.com; Tel.: +55-83-3216-7645; Fax: +55-83-3216-7787.

Abstract

Our research focused on optimizing the enzymatic hydrolysis conditions of the okra seed protein concentrate (OSPC), comparing to the antioxidant properties of the hydrolysed products obtained with the Alcalase® enzyme. Our experimental plan used a Central Composite Rotatable Design (CCRD) to identify the influence of the enzymatic concentration and hydrolysis time as independent variables over the responses in degree of hydrolysis (DH), protein recovery efficiency (PRE), total antioxidant capacity (TAC) and elimination of ABTS (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid) and DPPH (2,2-diphenyl-1-picrilidrazil) radicals. The independent variables strongly influenced DH, PRE and TAC. The hydrolysed products presented TAC varying from 31.14-51.54%, eliminating 37.10-52.60% of the DPPH and 73.04-84.23% of the ABTS radicals. With the response surfaces generated, we selected the hydrolysed product with DH 19.32% and TAC 51.54% as the one presenting the best hydrolytic capabilities. The results point that the hydrolysed products present biofunctional potential applicable as antioxidant compounds.

Keywords: Optimization, Okra seeds protein concentrates, Alcalase®, Protein hydrolysates, Antioxidant capacity.

1. Introduction

Many edible vegetables are known for their biological properties that make them potential functional or health promoting foods. Part of said properties are given by biologically active peptides and proteins (García, Puchalska, Esteve & Marina, 2013). According to Möller, Scholz-Ahrens and Roos (2008), the antioxidant peptides and amino acids are present in the protein matrix and are liberated by hydrolysis process, *in vivo* digestive tract or intestinal flora enzymes and *in vitro* exogenous enzyme action. However, the hydrolysis conditions applied, such as the kind of protease, enzymatic concentration, temperature and pH, might influence the formation of the peptides with antioxidant properties (Klompong, Benjakul, Kantachote & Shaidi 2007). This make necessary planning tools to investigate the effects of the hydrolysis parameters interactions on the proteins, as well as on their bioactivity (Ren et al, 2008; Guo & Tanokura, 2009).

The antioxidant properties of the peptides are related to their composition, amino acid sequence, size and three-dimensional structure of the molecules (Peña-Ramos, Xiong & Arteaga, 2004). According to Elias, Kellerby and Decker (2008), the amino acid residuals liberated after the hydrolysis act as chelating, free radical scavengers and hydro-peroxide redactors. Sarmandi and Ismail (2010) and Wu and Ding (2002) point that the use of hydrolysed protein compounds constituted by a mix of peptides, display biological activities when applied in food items.

Several studies have been conducted prospecting new protein sources with antioxidant properties based in hydrolysed compounds or isolated peptides from vegetal or animal sources, such as peanuts, palm kernel cake protein, soybean, olive seeds, flaxseed, chia and surimi by products (Jamdar et al., 2010; Ng, Ayob, Said, Osman, & Ismail, 2013; Yang, Yang, Li, Li & Jiang, 2011; Esteve, Marina & García, 2015; Segura-Campos, Salazar-Veja, Chel-Guerrero & Betancur-Ancona, 2013; Silva, O'callaghan, O'brien & Netto, 2012; Wiriyanphan, Chitsomboon & Yongsawadigul, 2012). Vegetal sources have been prioritized due to the increased demand of non-animal products.

In this context, the search for new natural compounds with potential antioxidant action have been studied, principally in peptides and amino acids (Zhu, Chen, Tang & Xiong, 2008). Vegetal protein sources cultivated in the Brazilian Northeast region that are under-exploited might become new perspectives in the area of bioactive compounds. In the region, the okra (*Abelmoschus esculentus* L. Moench) is a produce commonly cultivated due to its adaptability to the tropical weather. Okra seeds have been applied as therapeutics on popular medicine in

many parts of the world (Jarret, Wang & Levy, 2011). According to Soares et al. (2012) the seeds present an expressive protein content (22.4%), and their exploitation as a source of biofunctional compounds is innovative.

The present study focus on optimizing the hydrolysis conditions of the protein concentrate extracted from okra seeds in comparison to the antioxidant capabilities of the hydrolysed compounds obtained by the action of the Alcalase® enzyme.

2. Materials and Methods

2.1. Material

The okra seeds were obtained from local merchants (João Pessoa-PB, Brasil). Alcalase® from *Bacillus licheniformis* (activity of 2.4 AU g-1g protein) obtained from Novozymes, North America Inc. (Franklinton, N.C., U.S.A.). The DPPH (2,2-diphenyl-1-picrilidrazil) and ABTS (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid) radicals were obtained from Sigma-Aldrich® (St.Louis, MO, EUA). Solvents and other chemicals used were of analytical degree.

2.2. Obtaining the okra seed protein concentrate (OSPC) and enzymatic hydrolysis

After triturating the seeds in a Wiley® mill, the flour obtained was delipidated with hexane P.A. at room temperature (23±2 °C) for 72 h, with substitution of the hexane every three hours. To obtain the protein concentrate (OSPC) the delipidated flour was dispersed in a glycine 0.1 M, pH 9.0 (1:10) buffer and mixed for three hours at room temperature, followed by centrifugation (5000 rpm/ 30 min/4 °C) in a Sigma® refrigerated centrifuge. All steps were repeated and the final supernatant obtained was collected and mixed to the supernatant obtained in the anterior round. The pH was adjusted to 4.5 with HCL 1 M, precipitated proteins were isolated by centrifugation (5000 rpm/ 30 min/4 °C) and pH adjusted to 7.0 with NaOH 1M. The OSPC was then lyophilized and stored iunder refrigeration for further analysis.

The OSPC was hydrolysed with Alcalase® in a pH-stat DL 50 *Graphix* (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Switzerland) with substrate concentration 8% (w/v) and pH 8.0, following the manufacturer recommendations. The degree of hydrolysis (DH) was calculated according to Adler-Nissen (1986) and protein recovery efficiency according to Stadelman,

Olson, Shemwell and Pasch (1988) modified, and total protein determination by Kjeldahl, using $(N\% \times 5.75)$ (AOAC, 2010).

2.3. Experimental Planning

To obtain the best hydrolysis conditions the Central Composite Rotatable Design (CCRD) method was applied (Box, Hunter & Stuart, 1978), using 7 essays, 3 central points and 4 axial points. As independent variables, enzymatic concentration and hydrolysis time were chosen, and as response variables degree of hydrolysis (DH), protein recovery efficiency (PRE), total antioxidant capacity (TAC) and elimination of ABTS and DPPH radicals.

2.4. Electrophoretic profile

The electrophoretic profiles of the OSPC and hydrolysed compounds (1 to 11) were determined by SDS-PAGE-Tricine following Schaager and Jagow (1987). The gel was composed of separation gel (16.5 %T, 3 %C), spacing gel (10 %T, 3 %C) and stacking gel (4 %T, 3 %C). The samples were dissolved (10mg protein/1mL) in a reducer buffer pH 6.8 (Tris-HCL 0.5 M, 10 % of SDS, 10 % of glycerol, 5 % β -mercaptoethanol and 0.1 % of bromophenol blue) under 90 °C for 15 minutes. 30 μ l aliquots were applied to each well. After running the gel for approximately 6 hours, they were fixed for an hour in methanol/acetic acid/water solution (5:1:4), colored with coomassie brilliant blue G-250 and descolored with acetic acid 10%.

2.5. Determination of antioxidant activity

2.5.1. Total antioxidant capacity (TAC) of OSPC and hydrolysed protein compounds

The TAC was determined according to Prieto, Pineda and Aguilar (1999). 0.1 mL aliquots from samples (10mg/mL) diluted in distilled water were combined in tubes with 1mL of the reagent solution (sulphuric acid 600 mM, sodium phosphate 28 mM and ammonium molybdate 4mM). The tubes were incubated at 95 °C for 90 minutes, cooled to room temperature and then had their absorbance determined at 695 nm. The total antioxidant activity was expressed in relation to the ascorbic acid, calculated by Equation 1:

$$\% \text{ TAC} = (\text{As} - \text{Ac}) \times 100 / (\text{Aaa} - \text{Ac}) \quad (\text{Eq. 1})$$

Where Ac is control absorbance (white, no sample), As is the absorbance in the presence of the sample, and Aaa is the ascorbic acid absorbance

2.5.2 DPPH free radical scavenging capacity

The OSPC and hydrolyzed compounds' DPPH free radical scavenging capacity were determined according to the method of Morales and Jimenez-Perez (2001), with minor changes. 60 µl aliquots from samples (10 mg/mL) were mixed to 1.5 mL of DPPH solution (60µM) diluted in ethanol P.A. The mixture was agitated for 85 minutes at room temperature (20-25 °C) in absence of light, followed by centrifugation at 14500 rpm during 5 minutes and supernatant absorbance was measured at 517 nm. Trolox (6-hydroxyl-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) 1000 µM was used to create the standard curve. The scavenging capacity of the samples were expressed as the percentage of effect over the free radical following Equation 2:

$$\% \text{ Scavenging effect} = [(\text{Abs white} - \text{Abs sample}) / \text{Abs white}] \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

The Trolox equivalent antioxidant capacity coefficient (TEAC) was measured dividing the Trolox concentration by the curve and the final concentration of the samples in mg/mL.

2.5.3. ABTS free radical scavenging capacity

The OSPC and hydrolysed compound's ABTS•+ free radical scavenging was determined by the method described by Wiriayaphan, Chitsomboon and Yongsawadigul (2012), with minor changes. A stock solution of ABTS•+ was prepared by mixing a solution of ABTS (7 µM) and potassium persulfate (140 µM) and maintained protected from light during 16 h. The work solution was prepared diluting the stock solution in ethanol P.A. The standard curve were built using Trolox (1000 µM). 20 µL aliquots from samples (10 mg/mL) were mixed with 3 mL of the ABTS•+ radical solution, after 6 minutes a reading was performed at 734 nm. The ABTS•+ radical elimination capacity was calculated following Equation 3:

ABTS radical scavenging capacity (%) = $[(\text{Abs white} - \text{Abs sample} / \text{Abs white}) \times 100]$ (Eq.3)

The Trolox equivalent antioxidant capacity coefficient (TEAC) was calculated as described in 2.5.2.

2.6. Statistical Analysis

The response variables were analysed performing a variance analysis (ANOVA) using *Statistica* 5.0 (Inc. Tulsa, OK, USA) (Statistica, 2004), and SAS version 9.2 to the means and standard deviations. The means were compared applying the Scott Knot test with 5% significance ($p < 0.05$).

3. Results and Discussion

3.1. Optimization of the OSPC enzymatic hydrolysis

The Table 1 presents the responses obtained with the variation of enzymatic concentration and the hydrolysis time at the CCRD conditions.

The responses presented in Table 1 point that DH varied from 14.25 to 19.32%. Other works using other vegetal protein applying Alcalase®, in similar hydrolysis conditions and DH determination by pH-stat methods, registered DH of 16% for the hydrolysed gluten compound, agreeing with the present results (Kong, Zhou & Qian, 2007). The hydrolysed product from wheat germ obtained by Zhu, Zhou and Qian (2006) under hydrolysis time of 6 hours presented DH of 25%. Higher values were obtained by Esteve et al. (2015) using the hydrolysed product with residuals of olive seeds applying the o-phthalaldehyde (OPA) method (DH = 70%). According to Zhu et al. (2006), the differences in the DH values obtained with the same enzyme probably occur due to the hydrolysis conditions and the difference of methods used to measure the DH.

The PRE presented variation from 50.88 to 79.13%, results similar to the ones of Kong et al. (2007), where protein recovery from the gluten hydrolysed product was 81.3%. The TAC varied from 31.14 to 51.54%, DPPH from 37.10 to 52.6% and ABTS from 73.04 to 84.23%. The Table 2 presents the codified models of the DH, PRE and TAC responses. The results highlighted in the Equations are statistically significant at 95% confidence level ($p < 0.05$).

For the variable DH, table 2 points that the model estimated is adequate to describe the response under the studied circumstances, with determination coefficient 0.9497 and F_{cal}/F_{tab} 16.94. The p -value inferior to 0.05 indicates that the effects of time (T) and enzymatic concentration (EC) have significant influence over the DH. The results for the PRE shown at Table 2 present statistically significant effects ($p < 0.05$) on T and T x EC, with a quadratic model presenting regular determination coefficient of 0.8663 and F_{cal} 5.81 times higher than F_{tab} . For TAC, there was significant effect on T and EC quadratic, with the model presenting F_{cal}/F_{tab} ratio of 9.3 and determination coefficient 0.9120.

According to Box, Hunter and Stuart (1978), a model is considered predictive when the F_{cal}/F_{tab} ratio is higher than 3. In the present study, the ratio is higher than 3 to the response variables tested. Based on the results the models are statistically significant and predictive, describing the responses in function of the variables analysed. With this data, the response surfaces were built to evidence the analysis of the effects, allowing visualizing the variations on DH, PRE and TAC in function to the independent variables (Figure 1 A, B, C).

In Figure 1 A, it is possible to notice the existence of an optimal region for the DH among a spectre of combinations where T varies from 280 to 340 min and EC varies from 1.8 to 2.2%. The response surface points that the two independent variables presented influence over the DH, indicating that the elevation of T and EC increase the DH of the OSPC using the Alcalase® enzyme. The work of Silva et al. (2012), performed with the same enzyme, also verified increase on the DH with the increase of EC in the production a flaxseed hydrolysed protein compound. However, Jamdar et al. (2010) working with peanut seeds, and Hrcková, Rusnáková and Zemanovic (2002) with soybeans, promoting hydrolysis with the same endopeptidase obtained an increase on the DH increasing the reaction time. Hence, the data confirm that increasing reaction time and enzymatic concentration is directly proportional to the increase of DH.

In the Figure 1B, the increase of enzymatic concentration does not change the response of PRE. Even with the increase of the enzymatic concentration in the reaction wasn't capable of increase the PRE, this response might be relate to the enzyme action on the protein fragments during the hydrolysis, producing more free amino acids that do not contribute to the increase of the protein recovery. It was noticed that longer hydrolysis time causes higher protein recovery on the hydrolysed product from the OSPC. The results point toward the existence of an optimal time range between 300 and 340 minutes of hydrolysis time.

The optimal region for the TAC response (Fig 1C) is between 300 to 340 minutes (T) and 2.2% EC. Similar to the DH response, there is a relation between the increase of the

independent variables and the increase of the TAC of the hydrolysed products. The ABTS and DPPH responses did not obtained significant results among the studied range. These findings agree with the results registered by Vastag, Popovic, Popovic, Krimer and Pericin (2010) studying the enzymatic hydrolysis of pumpkin oil kernel protein with a fungal enzyme, and a E/S concentration range 4.1 – 6.5 HUT/mg, not registering influence of the enzymatic concentration on the capacity to eliminate the DPPH radical.

3.2. Electrophoretic profile of OSPC and hydrolysed protein compounds

The OSPC and 1 to 11 hydrolysed product samples went under a SDS-PAGE-Tricine to analyse the hydrolysis process employed. The electrophoretic profiles are presented in the Figures 2 A and B.

The Figures 2 A and B show that the OSPC present bands over 38 and under 8.5 kDa. After hydrolysis, diffuse bands between 3.5 and 8.5 kDa appear on all hydrolysed samples but number 3. The disappearance of most bands on treatments 3 and 4 (lines 5 and 6) on Figure 2 (a) make evident the effectivity of the enzymatic hydrolysis over the OSPC proteins under the studied conditions, with production of free peptides. Nevertheless, the gel does not retain peptides under 3.5 kDa, if produced. Intact proteins that resisted the Alcalase® hydrolysis were still detected.

The electrophoretic profile verified agree with the DH values from the hydrolysed products obtained in the essays (Table 1). The increase of DH on essays 4, 9 and 11 (19.32, 17.28 and 18.25% respectively) caused the disappearance of most protein bands and the presence of peptides. These results are justified by a higher level of peptide bonds broke with an increase of DH and larger production of low-mass peptides (Ren et al., 2008).

3.3. Antioxidant capacity on OSPC and hydrolysed protein products

3.3.1. TAC x DH evaluation

Figure 3 presents the correlation DH x TAC. The results for TAC display activity variation from 31.14 to 51.54% compared to the ascorbic acid activity.

According to the Pearson's Correlation test (Figure 3), DH displayed positive influence over the Total Antioxidant Capacity ($p < 0.05$), meaning that higher DH values create hydrolysed protein products with higher antioxidant properties. Liu, Kong, Xiong and Xia (2010) highlighted that DH has influence on the antioxidant activity of most hydrolysed

protein products. The higher DH values might relate to the production of shorter peptide chains, with higher antioxidant activity. The extended hydrolysis with $DH > 10\%$ produces peptides with a wide range of biological activities, including antioxidant properties (Mulero, Zafrilla, Martinez-Cacha, Leal & Abellan, 2011). The relationship between DH and antioxidant activity might relate to the liberation of lower mass peptides, increase of ionisable groups and exposition of concealed hydrophobic groups (Saramadi & Ismail, 2010).

3.3.2. DPPH and ABTS radicals scavenging capacity

The okra seed protein concentrate displayed moderate scavenging capacity for the DPPH radical (31.65%, Table 3), while the hydrolysed products ranged from 37.10 to 52.6%. These results were superior to the DPPH radical scavenging capacity of the hydrolysed protein compounds from various cultivars of Azufrado beans obtained with Alcalase® (25.81 to 44.05%) (Valdez-Ortiz, Fuentes-Gutiérrez, Germán-Báez, Gutiérrez-Dorado & Medina-Godoy, 2012), and in soybean hydrolysed products (100mg/mL) with 29% activity (Zhang, Li & Zhou, 2010). Still, Esteve et al. (2015) obtained more expressive results of DPPH radical scavenging (68.6%) with olive seed hydrolysed protein products using the same protease, but with higher DH (70.4%) measured by OPA.

With the ABTS radical, OSPC displayed weak scavenging capacity (12.7%); with remarkable increase of radical elimination capacity, ranging from 73.04 to 84.23% (40.02 to 45.98 $\mu\text{mol TEAC/mg/sample}$). These results are similar to the reports of Esteve et al. (2015), that registered 72% (36.3 $\mu\text{mol TEAC/mg/sample}$) elimination with olive seed hydrolysed compounds and Valdez-Ortiz et al. (2012), with anti-radical activity ranging from 77.2 to 99.9% (2.79-3.79 $\mu\text{mol TEAC/mg protein}$) on hydrolysed compounds from beans obtained using Alcalase®.

As seen on Table 3, there is statistical difference ($p < 0.05$) between the antioxidant activity of OSPC and the hydrolysed protein products on the different methods (ABTS and DPPH). These results can be explained due to the peptides being inactive inside of a protein sequence; being released with the hydrolysis with diminishing of the molecular mass, increase of ionisable groups and exposure of hydrophobic groups with higher capacity to eliminate free radicals (Möller et al., 2008).

Among the hydrolysed products, there were no differences on the DPPH essay. On the ABTS radical scavenging capacity, H1 (DH 14.36%) presented the lowest activity (73.04%) and H11 (DH 18.25%) the highest (84.23%), resulting in significant differences from the rest

of the products. The similar antioxidant capacity for most of the hydrolysed protein compounds might link to a synergy of the peptides with other antioxidant compounds that might have remained after hydrolysis. Araptisas (2008) identified the presence of polyphenolic compounds and flavonoids in okra seeds, and those might contribute to boost the peptides capacity to scavenge free radicals. Huang, Majumder & Wu (2010), verified that the presence of caffeine, quercitine and catequine had positive influence in the free radicals elimination activity displayed by the hydrolysed protein products of egg-whites, confirming the synergic effect.

4. Conclusions

Parting from the hydrolysis of the protein concentrate extracted from okra seeds using the Alcalase® enzyme, we obtained a hydrolysed product considered optimal, with enzymatic concentration of 2% and hydrolysis time of 300 minutes. Under these conditions, the product resulted in a higher degree of hydrolysis and higher total antioxidant capacity. The results evidence that hydrolysed protein products obtained from okra seeds present promising bioactive potential to the production of antioxidant compounds.

Acknowledgments

We acknowledge CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) for the financial support and scholarship granted to Edilza Silva do Nascimento. Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Centro de Ciências Exatas e da Natureza (CCEN), Centro de Tecnologia (CT) and Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA) for its institutional support.

References

- Adler-Nissen, J. (1986). Methods in food protein hydrolysates. In *Enzymatic hydrolysis of food protein* (pp 110-131). New York: Elsevier.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemistry. (2010). 18ed. 3a rev. Gaithersburg, MD, USA: AOAC International.
- Araptisas, P. (2008). Identification and quantification of polyphenolic compounds from okra seeds and skins. *Food Chemistry*. 110, 1041–1045.

- Box, G.E.P., Hunter, J.S., Stuart, J.S. (1978). Statistics for experimenters. New York, John Wiley & Sons.
- Elias, R. J., Kellerby, S. S. & Decker, E. A. (2008). Antioxidant Activity Of Proteins And Peptides. Critical Reviews. *Food Science And Nutrition*, 48 (5), 430 – 441.
- Esteve, C., Marina, M.L., & García, M.C. (2015). Novel strategy for the revalorization of olive (*Olea europaea*) residues based on the extraction of bioactive peptides. *Food Chemistry*, 167 , 272–280.
- García, M. C., Puchalska, P., Esteve, C., & Marina, M. L. (2013). Vegetable foods: a cheap source of proteins and peptides with antihypertensive, antioxidant, and other less occurrence bioactivities. *Talanta*, 106, 328–49.
- Guo, Y., Pan, D. & Tanokura, M. (2009). Optimization of hydrolysis conditions for the production of the angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from whey protein using response surface methodology. *Food Chemistry*, 114, 328–333.
- Hrcková, M., Rusnáková, M., & Zemanovic, J. (2002). Enzymatic hidrolisis of defatted soy flour by three diferente proteases and then effect on the functional proprieties of resulting protein hydrolysates. *Czech Journal of Food Science*, 20 (1), 7-14.
- Huang, W.-Y., Majumder, K., Wu, J. (2010). Oxygen radical absorbance capacity of peptides from egg white protein ovotransferrin and their interaction with phytochemicals. *Food Chemistry*, 123 (3), 635-641.
- Jamdar, S. N., Rajalakshmi, V., Pednekar, M. D., Juan, F., Yardi, V., & Sharma, A. (2010). Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate. *Food Chemistry*, 121(1), 178–184.
- Jarret, R.L., Wang, M.L., & Levy, I.J. (2011). Seed oil and fatty acid content in okra (*Abelmoschus esculentus*) and related species. *J. Agric. Food Chemistry*, 59, 4019–4024.
- Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D. & Shaidi, F. (2007). Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysates of yellow stripe trevally (*dearoides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food Chemistry*, 102, 1317–1327.
- Kong, X., Zhou, H., & Qian, H. (2007). Enzymatic hydrolysis of wheat gluten by proteases and properties of the resulting hydrolysates. *Food Chemistry*, 102(3), 759–763.
- Liu, Q., Kong, B., Xiong, Y.L., Xia, X. (2010). Antioxidant activity and functional properties of porcine plasma protein hydrolysates as influenced of the degree of hydrolysis. *Food Chemistry*. 2, 403–410.
- Möller, N., Scholz-Ahrens, K., Roos, N., & Schrezenmeir, J. (2008). Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. *European Journal of Nutrition*, 47, (4) 171-182.

- Morales, F.J., & Jimenez-Perez, S., 2001, Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to colour and fluorescence. *Food Chemistry*, 72, 119–125.
- Mulero, J., Zafrilla, P., Martinez-Cacha, A., Leal, M., & Abellan, J. (2011). Peptidos bioactivos. *Clínica e Investigación en Arterioesclerosis*, 23, 5, 219-227.
- Ng, K. L., Ayob, M. K., Said, M. S., Osman, M. A., & Ismail, A. (2013). Optimization of enzymatic hydrolysis of palm kernel cake protein (PKCP) for producing hydrolysates with antiradical capacity. *Industrial Crops and Products*, 43, 725–731.
- Peña-Ramos, E. A., Xiong, Y. L., & Arteaga, G. E. (2004). Fractionation and characterisation for antioxidant activity of hydrolysed whey protein. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, (14), 1908-1918.
- Prieto P, Pineda M, & Aguilar M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal Biochem* 269: 337-341.
- Ren, J., Zhao, M., Shi, J., Wang, J., Jiang, Y., Cui, Ch., Kakuda, Y. & Jun, X.S. (2008). Optimization of antioxidant peptide production from grass carp sarcoplasmic protein using response surface methodology. *Food Science and Technology*, 41, 1624–1632.
- Sarmadi, B. H., & Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: a review. *Peptides*, 31(10), 1949–56.
- Schagger, H., & Jagow, V. (1987). Tricine–sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, 166, 368–379.
- Segura-Campos, M.R., Salazar-Veja, I.M., Chel-Guerrero, L.A., Betancur-Ancona, D.A. (2013). Biological potential of chia (*Salvia hispanica* L.) protein hydrolysates and their incorporation into functional foods. *LWT - Food Science and Technology*, 50, (2), 723–731.
- Silva, F. G. D., O’callaghan, Y., O’Brien, N. M., Netto, F. M. (2012). Antioxidant Capacity of Flaxseed Products: The Effect of In vitro Digestion. *Plant Foods for Human Nutrition*. 68, (1), 24-30.
- Soares, G.D.F., Gomes, V.D., Albuquerque, A.D., Dantas, M.B., Rosenhain, R., Souza, A.G., Persunh, D.C., Gadelha, C.A.D., Costa, M.J.D., Gadelha, T.S. (2012). Spectroscopic and thermooxidative analysis of organic okra oil and seeds from *Abelmoschus esculentus*. *Science World J.*, 3–8.
- Stadelman, W. J., Olson, V. M., Shemwell, G. A. Pasch, S. (1988). Egg and Poultry-Meat Processing. Ellis and Horwood, Chichester, UK.
- Statistica. Statistica for Windows Software. v. 5.0, Tulsa, OK, USA, 2004.
- Valdez-Ortiz, A., Fuentes-Gutiérrez, C.I., Germán-Báez, L.J., Gutiérrez-Dorado, R., & Medina-Godoy, R. (2012). Protein hydrolysates obtained from Azufrado (sulphur

- yellow) beans (*Phaseolus vulgaris*): Nutritional, ACE-inhibitory and antioxidative characterization. *LWT - Food Science and Technology*, 46, 91-96.
- Vastag, Z., Popovic, L., Popovic, S., Krimer, V., Pericin, D. (2010). Hydrolysis of pumpkin oil cake protein isolate and free radical scavenging activity of hydrolysates: influence of temperature, enzyme/substrate ratio and time. *Food and Bioprod. Process*, 88, 277–282.
- Wiriyanphan, C., Chitsomboon, B., & Yongsawadigul, J. (2012). Antioxidant activity of protein hydrolysates derived from threadfin bream surimi byproducts. *Food Chemistry*, 132, 104–111.
- Wu, J., & Ding, X. (2002). Characterization of inhibition and stability of soy-protein-derived angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides. *Food Research International*, Elsevier, 35, 367-375.
- Yang, B., Yang, H., Li, J., Li, Z., Jiang, Y. (2011). Amino acid composition, molecular weight distribution and antioxidant activity of protein hydrolysates of soy sauce lees. *Food Chemistry*, 124, 2, 551-555.
- Zhang, L., Li, J., & Zhou, K. (2010). Chelating and radical scavenging activities of soy protein hydrolysates prepared from microbial proteases and their effect on meat lipid peroxidation. *Bioresource Technology*, 101(7), 2084-2089.
- Zhu, K., Zhou, H. & Qian, H. (2006). Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. *Process Biochemistry*, 41, (6), 1296-1302.
- Zhu, L., Chen, J., Tang, X., & Xiong, Y. L. (2008). Reducing, Radical Scavenging, and Chelation Properties of in Vitro Digests of Alcalase-Treated Zein Hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, (8), 2714-2721.

Figure Captions

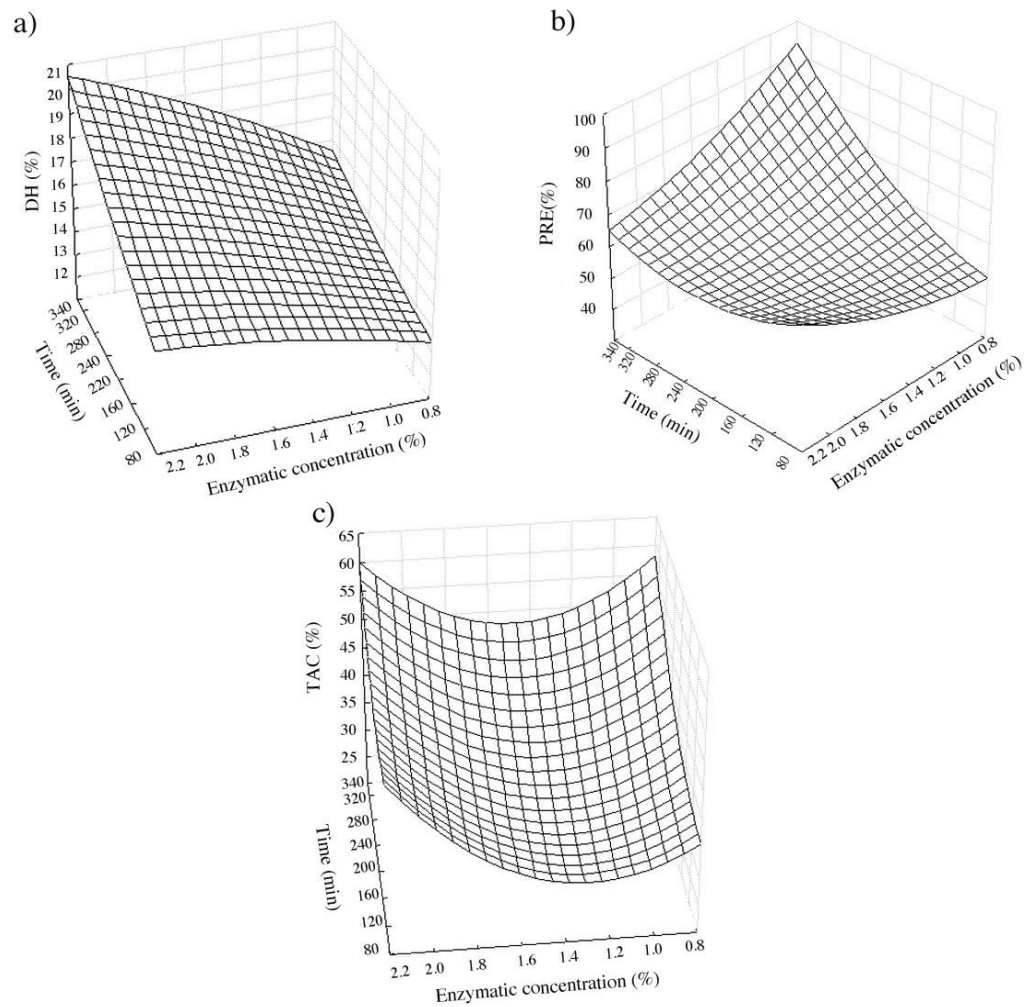


Fig. 1. Response surfaces generated by the Central Composite Rotatable Design (CCRD) for the dependent variables: (a) – Degree of hydrolysis (DH), (b) – Protein recovery efficiency (PRE), (c) Total antioxidant capacity (TAC).

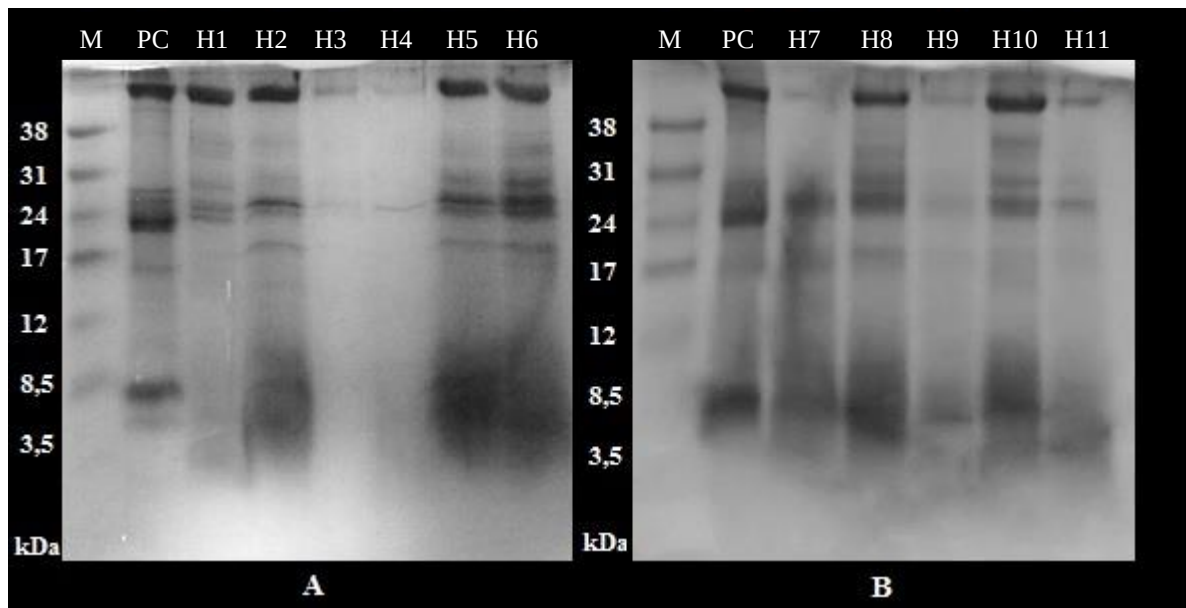


Fig. 2. A and B: OSCP and OSHP electrophoretic profiles (SDS/PAGE-Tricine) (a) (M) GE molecular marker, (PC) OSCP (76g ptn/100g of sample) and (H1 to H6), OSHP 1 to 6 respectively. (b): (M) GE molecular marker, (PC) OSCP (76g ptn/100g sample) and (H7 to H11) OSHP 7 to 11 respectively. Okra Seed Protein Concentrate (OSPC)/Okra Seed Hydrolysed Product (OSHP)

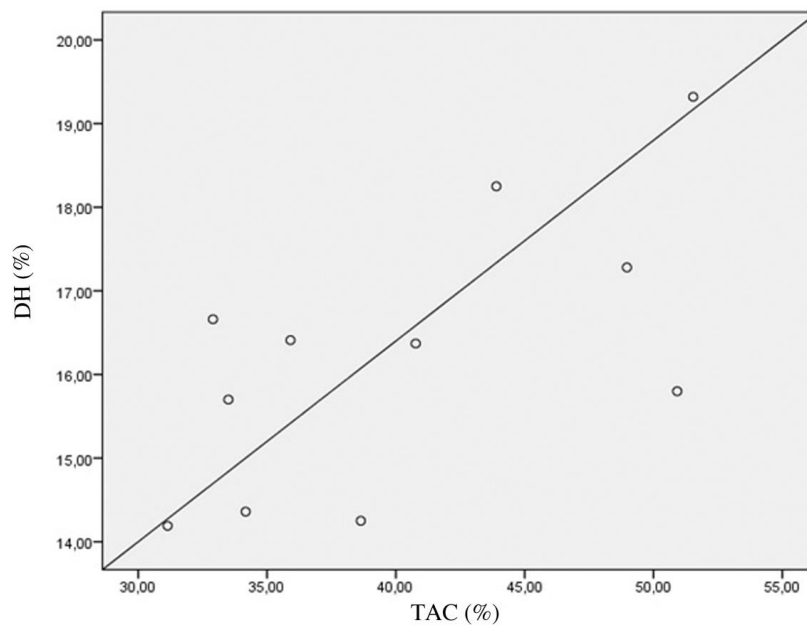


Fig. 3. Pearson's Correlation for DH x TAC of the hydrolysed protein products obtained from OSCP ($p < 0.05$). Degree of Hydrolysis (DH)/Total Antioxidant Capacity (TAC)/Okra Seed Protein Concentrate (OSPC)

Tables Captions

Table 1

Matrix of Central Composite Rotatable Design (CCRD) and responses to Degree of Hydrolysis (DH), Protein Recovery Efficiency (PRE), Total Antioxidant Capacity (TAC), DPPH and ABTS Radicals Elimination of the hydrolysed protein obtained using Alcalase® enzyme

Essays	Independent Variables		Dependent Variables				
	Enzymatic Concentration (%)	Time (min)	DH (%)	PRE (%)	TAC (%)	DPPH (%)*	ABTS (%)**
1	-1 (1.0)	-1 (120)	14.36	56.63	34.17	52.60	73.04
2	+1 (2.0)	-1 (120)	16.37	62.38	40.77	51.65	80.03
3	-1 (1.0)	+1 (300)	15.80	76.63	50.92	51.75	76.53
4	+1 (2.0)	+1 (300)	19.32	58.63	51.54	49.65	77.38
5	0 (1.5)	0 (210)	16.41	60.38	35.91	41.00	79.60
6	0 (1.5)	0 (210)	15.70	56.88	33.50	39.70	81.96
7	0 (1.5)	0 (210)	16.66	56.50	32.90	38.85	79.37
8	- α (0.8)	0 (210)	14.25	61.75	38.64	40.60	79.37
9	+ α (2.2)	0 (210)	17.28	61.63	48.97	37.10	81.63
10	0 (1.5)	- α (80)	14.19	50.88	31.14	44.20	78.00
11	0 (1.5)	+ α (340)	18.25	79.13	43.90	42.50	84.23

*2,2-diphenyl-1-picrilidrazil (DPPH)

**2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid (ABTS)

Table 2

Codified model equations, Fcal/Ftab ratio and R² for the response variables Degree of Hydrolysis (DH), Protein Recovery Efficiency (PRE) and Total Antioxidant Capacity (TAC)

Codified Variables	Equation	Fcal/Ftab Ratio	R ²
DH	16.26 + 1.27(T) + 0.099 (T)² + 1.23(EC) - 0.13(EC)² + 0.38(T x EC)	16.94	94.97
PRE	57.92 + 7.03(T) + 3.60 (T)² - 1.55(EC) + 1.94(EC)² - 5.94 (T x EC)	5.81	86.63
TAC	34.10 + 5.70(T) + 2.63(T)² + 2.73(EC) + 5.77(EC)² - 1.50(TxEC)	9.30	91.20

T= Hydrolysis Time/EC= Enzymatic Concentration

Table 3

DPPH and ABTS radicals scavenging capacity for the OPSC and hydrolysed protein products H1 to H11 obtained by Central Composite Rotatable Design (CCRD)

Samples	DPPH elimination (%)	DPPH (μ mol TEAC/mg of sample)*	ABTS elimination (%)	ABTS (μ mol TEAC/mg of sample)*
OSPC	31.65 $\pm$ 0.33e	4.10 $\pm$ 0.18	12.70 $\pm$ 0.16f	7.86 $\pm$ 0.09
H1	52.60 $\pm$ 0.56a	5.74 $\pm$ 0.12	73.04 $\pm$ 0.22e	40.02 $\pm$ 0.12
H2	51.65 $\pm$ 0.63a	5.66 $\pm$ 0.13	80.03 $\pm$ 0.75c	43.74 $\pm$ 0.40
H3	51.75 $\pm$ 0.64a	5.67 $\pm$ 0.05	76.53 $\pm$ 0.36d	41.88 $\pm$ 0.19
H4	49.65 $\pm$ 0.21a	5.51 $\pm$ 0.02	77.38 $\pm$ 0.22d	42.34 $\pm$ 0.12
H5	41.00 $\pm$ 0.28c	4.83 $\pm$ 0.01	79.60 $\pm$ 0.86c	43.52 $\pm$ 0.46
H6	39.70 $\pm$ 0.71c	4.73 $\pm$ 0.05	81.96 $\pm$ 0.22b	44.78 $\pm$ 0.12
H7	38.85 $\pm$ 0.92d	4.66 $\pm$ 0.07	79.37 $\pm$ 0.08c	43.39 $\pm$ 0.04
H8	40.60 $\pm$ 0.57c	4.80 $\pm$ 0.05	79.37 $\pm$ 0.43c	43.39 $\pm$ 0.23
H9	37.10 $\pm$ 0.14d	4.53 $\pm$ 0.01	81.63 $\pm$ 0.82b	44.60 $\pm$ 0.97
H10	44.20 $\pm$ 0.71b	5.08 $\pm$ 0.05	78.00 $\pm$ 0.08d	42.66 $\pm$ 0.04
H11	42.50 $\pm$ 0.28b	4.95 $\pm$ 0.02	84.23 $\pm$ 0.78a	45.98 $\pm$ 0.42

*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC)

2,2-diphenyl-1-picrilidrazil (DPPH)/ 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid (ABTS)

Mean $\pm$ Standard Deviation for three repetition

Values followed by the same letter in the column are not considered different by the Scott Knott test ($p < 0.05$).

ARTIGO II

Hidrolisado proteico de sementes de quiabo (*Abelmoschus esculentus* L. Moench): composição centesimal, aminoacídica, capacidade antioxidante e perfil eletroforético

Resumo

O concentrado proteico de sementes de quiabo (CPSQ) foi hidrolisado utilizando a enzima Alcalase® e subsequentemente avaliado quanto a composição centesimal, aminoacídica, capacidade antioxidante e perfil eletroforético do hidrolisado obtido. No CPSQ foi recuperado 76% de proteína da semente, o hidrolisado exibiu capacidade antioxidante maior que o CPSQ em todos os ensaios, capacidade antioxidante total (TAC) (54,51%), DPPH (49,65%) e ABTS (77,38%). A composição de aminoácidos total do hidrolisado mostrou considerável teor de aminoácidos com capacidade de eliminação de radicais livres. O perfil eletroforético do hidrolisado revelou a efetividade da enzima Alcalase® na hidrólise da maioria das proteínas do CPSQ, gerando peptídeos de baixa massa molecular ($< 3,5$ kDa). A partir dos resultados encontrados conclui-se que o hidrolisado proteico de sementes de quiabo surge como um composto bioativo promissor, com capacidade antioxidante e potencial para ser explorado em futuras pesquisas visando o isolamento dos peptídeos bioativos presentes no hidrolisado obtido a partir do CPSQ.

Palavras-chave: Radicais livres, antioxidantes, sementes de quiabo, hidrolisado, peptídeos bioativos.

1. Introdução

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são gerados através de reações fisiologicamente normais no organismo humano durante o processo respiratório em organismos aeróbios (Je, Qian, Byun & Kim, 2007; Evans, Goldfine, Maddux & Grodsky, 2003). Essas espécies reativas produzidas fisiologicamente podem exercer diversas funções, como sinalização e fornecimento de defesa contra infecções (Valko et al., 2007; Johansen, Harris, Rychly & Ergul, 2005). No entanto, em quantidades excessivas as EROs causam dano celular e envelhecimento, e estão envolvidas na iniciação ou progresso de várias doenças degenerativas, incluindo a aterosclerose, artrite, diabetes, Alzheimer e câncer (Matsuda & Shimomura, 2013; Halliwell, 2013).

Em contrapartida, os agentes antioxidantes desempenham um papel vital para reduzir os processos oxidativos no organismo humano (Elias, Kellerby, & Decker, 2008). Portanto, o consumo de antioxidantes visa a redução do dano oxidativo *in vivo*, reduzindo assim, a incidência de doenças humanas (Halliwell, 2013). Diversos compostos naturais já conhecidos tais como fenólicos, vitaminas, minerais e proteínas, tem sido descritos como agentes com

capacidade de eliminar radicais livres, e sua função como antioxidantes no organismo humano apresentam relatos na literatura (Kanner, Gorelik, Roman & Kohen, 2012).

Nas últimas duas décadas, hidrolisados proteicos e peptídeos estão sendo foco constante e crescente de pesquisas, principalmente pela variabilidade de aplicações biológicas destas moléculas, dentre as quais a capacidade antioxidante. Diversas fontes proteicas, tais como grão de bico, farelo de glúten de milho, ostras e ovos têm demonstrado capacidade de eliminação de radicais livres (Zhang, Li, Miao & Jiang, 2011; Zhuang, Tang & Yuan, 2013; Wang et al., 2014, Chen, Chi, Zhao, Lv, 2012).

Por apresentarem um teor de proteínas em torno de 22,0% (Soares et al., 2012), as sementes de quiabo (*Abelmoschus esculentus* L. Moench), são uma fonte promissora para produção de hidrolisados protéicos. No entanto, poucos estudos têm explorado as sementes desta hortaliça que vem sendo empregada como terapêutico na medicina popular em várias partes do mundo (Jarrete, Wang & Levy, 2011). As proteínas presentes nas sementes podem surgir como fonte para obtenção de hidrolisados, fornecendo compostos e peptídeos biologicamente ativos.

Diante disso, a presente pesquisa objetivou produzir hidrolisado das proteínas concentradas das sementes de quiabo, bem como avaliar a composição centesimal, aminoacídica, e relacionar a composição com a expressão da capacidade antioxidante.

2. Material e métodos

2.1 Material

As sementes de quiabo foram obtidas no comércio local (João Pessoa / PB, Brasil). A enzima Alcalase® 2.4L (produzida por *Bacillus licheniformis*) foi obtida comercialmente da Novozymes, North America Inc. (Franklinton, N.C., E.U.A). Os radicais 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH) e 2,2'-azinobis- (3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid (ABTS) foram obtidos da Sigma-Aldrich® (St.Louis, MO, EUA). Os solventes utilizados foram de grau HPLC, e todos os outros produtos químicos eram de grau analítico.

2.2 Obtenção do concentrado proteico de sementes de quiabo (CPSQ) e hidrólise enzimática

O concentrado proteico de sementes de quiabo (CPSQ) foi obtido a partir da farinha desengordurada de sementes de quiabo (FDSQ) com hexano. A FDSQ foi submetida a

extração alcalina em tampão glicina 0,1M, pH 9 (1:10) seguida de precipitação a pH 4,5 com HCl 1 N e separada por centrifugação para obtenção do CPSQ. O CPSQ foi hidrolisado com Alcalase®, usando pH-stat modelo DL 50 *Graphix* (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Suíça) com concentração de substrato de 8% (m/v) e pH 8,0 de acordo com as recomendações do fabricante. A seleção das condições de hidrólise (concentração enzimática: 2,0%, tempo: 300 min) foram baseadas nos resultados de um delineamento composto central rotacional (DCCR) realizado em estudos preliminares. O grau de hidrólise (GH) foi calculado conforme recomendação de Adler-Nissen (1986).

2.3 Determinação da composição centesimal aproximada FISQ, FDSQ, CPSQ e HPSQ

O conteúdo de cinzas, umidade, proteína, gordura e carboidrato da FISQ (farinha integral de semente de quiabo), FDSQ, CPSQ e HPSQ foram determinados de acordo com o método da AOAC (2010). A gordura foi determinada de acordo com Bligh; Dyer (1959). Para proteína por Kjeldahl utilizou-se o fator de 5,75 para conversão do N em proteína ($N\% \times 5,75$).

2.4 Determinação do perfil de aminoácidos totais e livres

A análise de aminoácidos foi realizada em cromatógrafo líquido (Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan) em coluna de fase reversa C18 - Luna - Phenomenex (250 mm x 4,6 mm, 5 μ m; Phenomenex Inc., Torrence, CA, USA). Os aminoácidos foram quantificados por comparação com padrão de aminoácidos Thermo Scientific (Rockford, EUA). Utilizou-se padrão interno ácido α -aminobutírico (Sigma-Aldrich®, St.Louis, MO, EUA). A quantificação de aminoácidos totais e livres foi realizada seguindo os métodos descritos por Hagen, Frost e Augustin (1989) e White, Hart e Fry (1986).

2.5 Perfil eletroforético SDS-PAGE (Gel de poliacrilamida na presença de SDS)- Tricina

Os perfis eletroforéticos do CPSQ e do hidrolisado proteico de sementes de quiabo (HPSQ) foram determinados por SDS-PAGE- Tricina de acordo com Schagger, Jagow (1987). Os géis consistiam de uma resolução: gel de separação (16,5 %T, 3 %C), gel espaçador (10 %T, 3 %C) e gel de empilhamento (4 %T, 3 %C). As amostras foram dissolvidas (10mg proteína/1mL) em tampão redutor pH 6,8 (Tris-HCl 0,5 M, 10 % de SDS, 10 % de glicerol, 5 % β -mercaptoetanol e 0,1 % azul de bromofenol) e submetidas a 90 °C

por 15 min. Alíquotas de 30 µl foram aplicadas em cada poço. Após a corrida dos géis por aproximadamente 6 h, estes foram fixados por 1 h em solução de metanol/ácido acético/água (5:1:4), corados com coomassie brilliant blue G-250 (0,04 % em 10 % ácido acético) e descorados em ácido acético 10 %.

2.6 Determinação da atividade antioxidante do CPSQ e HPSQ

2.6.1 Capacidade antioxidante total (TAC)

A TAC foi determinada conforme descrita por Prieto, Pineda e Aguilar (1999). Alíquotas de 0,1 mL de amostra (10 mg/mL) diluídas em água destilada foram combinadas em tubos com 1 mL da solução reagente (ácido sulfúrico 600 mM, fosfato de sódio 28 mM e molibdato de amônio 4 mM). Os tubos foram incubados a 95°C por 90 min, resfriados à temperatura ambiente, e em seguida foi determinada a absorbância a 695 nm. A atividade antioxidante total foi expressa em relação ao ácido ascórbico e calculada pela Equação 1:

$$\% \text{ TAC} = (A_s - A_c) \times 100 / (A_{aa} - A_c) \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde A_c é a absorbância do controle (branco sem amostra), A_s é a absorbância na presença de amostra e A_{aa} é a absorbância do ácido ascórbico.

2.6.2 Capacidade sequestrante do radical DPPH

A capacidade sequestrante do radical DPPH pelo CPSQ e hidrolisados foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Morales & Jimenez-Perez (2001), com modificações. Alíquota de 60µl de amostra (10 mg/mL) foi misturada a 1,5 mL de solução de DPPH (60µM) diluído em etanol P.A. A mistura foi agitada durante 85 min, à temperatura ambiente (20-25 °C) e na ausência de luz, em seguida, a amostra foi centrifugada a 14,500 rpm durante 5 min e a absorbância do sobrenadante foi mensurada em comprimento de onda de 517 nm. O Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) 1000 µM. O Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) 1000 µM, foi usado para construção da curva padrão. A capacidade sequestrante das amostras foi expressa como a percentagem do efeito sobre o radical livre conforme Equação 2:

$$\% \text{ Efeito sequestrante} = [(Abs \text{ branco} - Abs \text{ amostra}) / Abs \text{ branco}] \times 100 \text{ (Eq. 2)}$$

O coeficiente de capacidade antioxidante equivalente de Trolox (TEAC) foi calculado dividindo a concentração de Trolox pela curva e a concentração final da amostra em mg/mL.

2.6.3 Capacidade sequestrante do radical ABTS

A capacidade sequestrante do radical ABTS^{•+} pelo CPSQ e hidrolisados foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Wiriyaphan, Chitsomboon e Yongsawadigul (2012), com algumas modificações. Uma solução estoque de ABTS^{•+} foi preparada, por mistura da solução de ABTS (7 µM) e persulfato de potássio (140 µM) e mantida ao abrigo da luz durante 16 h. A solução de trabalho foi elaborada diluindo a solução estoque em etanol P.A. A curva padrão foi construída usando Trolox (1000 µM). Alíquota de 20 µL de amostra (10 mg/mL) foi misturada com 3,0 mL da solução do radical ABTS^{•+}, após 6 min a leitura foi realizada a 734 nm. A capacidade de eliminação do radical ABTS^{•+} foi calculada de acordo com a Equação 3:

$$\text{Capacidade de eliminação de radicais ABTS (\%)} = [(Abs \text{ branco} - Abs \text{ amostra} / Abs \text{ do branco}) \times 100] \text{ (Eq.3)}$$

O coeficiente de capacidade antioxidante equivalente de Trolox (TEAC) foi calculado conforme já descrito no item 2.6.2.

2.7 Análise estatística

Os dados deste estudo foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA). As médias foram comparadas utilizando-se o teste de Tukey, as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas a $p < 0,05$.

3. Resultados e discussão

3.1 Composição Centesimal aproximada: FISQ, FDSQ, CPSQ e HPSQ

A composição centesimal aproximada da FISQ, FDSQ, CPSQ e HPSQ está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1

Composição centesimal aproximada: Farinha integral de sementes de quiabo (FISQ), farinha desengordurada de sementes de quiabo (FDSQ), concentrado proteico de sementes de quiabo (CPSQ) e hidrolisado proteico de sementes de quiabo (HPSQ) (g/100g)

Composição (%)	FISQ	FDSQ	CPSQ	HPSQ
Umidade	9,32±0,03*	12,01±0,04*	5,29±0,20*	5,71±0,03*
Cinzas	4,75±0,01*	5,20±0,03*	1,66±0,01*	3,75±0,03*
Proteína**	22,08±0,33*	24,20±0,10*	76,00±0,01*	65,13±0,65*
Lipídeos	15,12±0,16*	2,45±0,15*	10,93±0,01*	10,13±0,05*
Carboidratos***	48,73±0,45*	56,15±0,21*	6,12±0,18*	15,28±0,65*

*Média ± desvio padrão de três repetições

** N% x 5,75

*** Calculado por diferença

Na farinha integral obteve-se um teor de proteína de 22,08% e lipídeos de 15,12%, resultados comparáveis aqueles relatados por Soares et al. (2012), que constataram teores significativos de proteína (22,14%) e lipídeos (14,01%) nas sementes de quiabo. O teor de proteína total das sementes de quiabo pode ser comparado com proteínas de outras sementes, tais como chia com 22,7% (Sandoval-Oliveros & Paredos-López, 2013), feijão comum com 22% (Valdez-Ortiz, Fuentes-Gutiérrez, Germán-Báez, Gutiérrez-Dorado & Medina-Godoy, 2012) e linhaça que apresenta 29,3% (Silva, O'callaghan, O'brien & Netto, 2012), demonstrando seu potencial como fonte proteica a ser explorada na obtenção de hidrolisados e/ou peptídeos bioativos.

Nesse estudo, a proteína do CPSQ é o componente majoritário e de maior interesse para a produção do hidrolisado proteico, com teor correspondente de 76g/100g, determinado pelo método de Kjeldhal (N% 5,75). A recuperação (%) da proteína no CPSQ foi comparável a encontrada para isolado proteico de canola, 76,2% (Alashi et al., 2014). Todavia, foi superior a outras proteínas vegetais, tais como variedades de feijões Azufrado Higuera, Azufrado Noroeste e Azufrado Regional com 61,0%, 58,0% e 66,0% respectivamente (Valdez-Ortiz, Fuentes-Gutiérrez, Germán-Báez, Gutiérrez-Dorado & Medina-Godoy, 2012) e ervilha 48,5% (Tömösközi, Lásztity, Haraszi & Baticz, 2001). A proteína total recuperada no HPSQ foi de 65,13 %, esse resultado encontra-se próximo ao relatado por Alashi et al. (2014), no hidrolisado proteico de farinha de canola utilizando Alcalase® (75,80%).

3.2 Atividade antioxidante: TAC, DPPH e ABTS

A Tabela 2 apresenta os resultados para a TAC e de eliminação dos radicais DPPH e ABTS do CPSQ e HPSQ obtido a partir da ação da enzima Alcalase®.

Tabela 2

Capacidade antioxidante total (TAC) e de eliminação dos radicais DPPH e ABTS do concentrado proteico de sementes de quiabo (CPSQ) e hidrolisado proteico de sementes de quiabo (HPSQ)

Amostras	TAC (%)	Eliminação de DPPH (%)	DPPH (μmol TEAC/mg de amostra)**	Eliminação de ABTS (%)	ABTS (μmol TEAC/mg de amostra) **
CPSQ	28,68±0,55*	31,65±0,33*	4,10±0,18*	12,70±0,16*	7,86±0,09*
HPSQ	54,51±0,53*	49,65±0,21*	5,51±0,02*	77,38±0,22*	42,34±0,12*

*Média ± desvio padrão de três repetições

**TEAC- Capacidade antioxidante equivalente de Trolox

A partir dos dados apresentados na Tabela 2, verifica-se que o HPSQ apresenta atividade antioxidante superior para a TAC (54,51%), DPPH (49,65%) e ABTS (77,38%), quando comparado ao CPSQ, com valores de TAC (28,68%), DPPH (31,65) e ABTS (12,70%). Estes resultados evidenciam que a hidrólise das proteínas pela Alcalase® leva à produção de hidrolisado com capacidade antioxidante maior que a encontrada na matéria prima original. Isso ocorre provavelmente, devido os hidrolisados proteicos apresentarem aminoácidos expostos que reagem mais efetivamente com os compostos radicalares que as proteínas intactas (Elias, Kellerby & Decker, 2008). Outros estudos também relataram o mesmo comportamento entre a proteína intacta e seus hidrolisados. Tironi e Anon (2010), relataram que o isolado proteico de amaranto apresentou capacidade sequestrante do radical ABTS inferior ao de seu hidrolisado e Jamdar et al., (2010), observaram maior capacidade de quelar metais e poder redutor para os hidrolisados de amendoim do que para o seu concentrado proteico.

A diferença entre os resultados mostrada pela aplicação de diferentes métodos utilizados para mensurar a capacidade antioxidante, resultou em valor mais expressivo para o sequestro do ABTS pelo HPSQ (77,38%). Os resultados encontrados neste estudo corroboram com os descritos para hidrolisado de torta de dendê (Ng, Ayob, Said, Osman, & Ismail, 2013), hidrolisado de variedades de feijões (Valdez-Ortiz, Fuentes-Gutiérrez, Germán-Báez, Gutiérrez-Dorado & Medina-Godoy, 2012) e hidrolisado de sementes de oliva (Esteve; Marina & García, 2015). Adicionalmente, esses estudos verificaram maior capacidade de eliminação radicalar do ABTS quando comparado ao DPPH.

O mecanismo de reação dos métodos ABTS e DPPH baseia-se na transferência de elétrons, todavia o ABTS apresenta maior sensibilidade para os diversos compostos oxidantes (Mcdonald-Wicks, Wood & Garg, 2006).

3.3 Perfil de aminoácidos

3.3.1 Composição de aminoácidos totais

A composição de aminoácidos totais do CPSQ e HPSQ está descrita na Tabela 3.

Tabela 3

Composição de aminoácidos totais (g/100g de proteína) do concentrado proteico de sementes de quiabo (CPSQ) e hidrolisado proteico de sementes de quiabo (HPSQ)

Aminoácidos totais (g/100g de proteína)	Símbolo	CPSQ	HPSQ
Ácido aspártico	Asp	8,36±0,11	12,10±0,26
Ácido glutâmico	Glu	14,29±0,16	20,80±0,22
Serina	Ser	4,61±0,03	6,65±0,07
Glicina	Gly	3,37±0,04	4,68±0,05
Histidina	His	2,09±0,03	2,85±0,04
Arginina	Arg	10,58±0,13	14,29±0,14
Treonina	Thr	3,20±0,02	4,46±0,04
Alanina	Ala	2,94±0,05	4,08±0,03
Prolina	Pro	3,15±0,03	4,36±0,02
Tirosina	Tyr	3,18±0,01	4,71±0,23
Valina	Val	4,35±0,04	6,25±0,11
Metionina	Met	2,15±0,07	3,00±0,09
Cistina	Cys	0,23±0,02	0,35±0,01
Isoleucina	Ile	3,78±0,06	5,07±0,10
Leucina	Leu	4,79±0,03	6,42±0,10
Fenilalanina	Phe	3,63±0,01	4,72±0,08
Lisina	Lys	5,79±0,09	7,54±0,07
Total de aminoácidos hidrofóbicos		28,15±0,33	38,58±0,58

Média ± desvio padrão de três repetições; Total de aa Hidrofóbicos = Gly, Ala, Val, Leu, Pro, Met, Phe e Ile. Triptofano- não identificado por este método.

Verifica-se na Tabela 3, que no CPSQ o maior conteúdo de aminoácidos corresponde à Glu, Arg e Asp com 14,29, 10,58 e 8,36g/100g de proteína, respectivamente. Estes aminoácidos se destacam em proteínas vegetais, pois captam e estocam nitrogênio nas proteínas de reserva (Polanco-Lugo, Davila-Ortiz, Betancur-Ancona & Chel-Guerrero, 2014).

A composição de aminoácidos em hidrolisados de proteínas demonstra papel importante no mecanismo da atividade antioxidante dos peptídeos presentes após o processo hidrolítico (Udenigwe & Aluko, 2011;. Zhao et al, 2012). De acordo com Sarmadi e Ismail (2010), devido ao grupo carboxil na extremidade da cadeia dos aminoácidos de caráter ácido (Glu e Asp), estes podem atuar como quelantes de minerais, tais como ferro e doadores de prótons. Pode-se observar (Tab. 3) no hidrolisado obtido, elevado teor dos aminoácidos Glu e Asp com 20,80 e 12,10 g/100g de proteína, respectivamente; valores comparáveis aos resultados relatados por Megías et al. (2008), que em hidrolisados de sementes de girassol encontraram teores de Glu e Asp com 22,9 e 9,8 g/100g de proteína, respectivamente.

No estudo de Chen, Yang, Sun, Niu e Liu (2012), os aminoácidos alanina, ácido aspártico e fenilalanina que possuem característica hidrofóbica, foram isolados a partir do hidrolisado de nozes, e constatou-se que estes foram responsáveis pela capacidade antioxidante no sistema β -caroteno/ácido linoleico. O considerável teor de aminoácidos hidrofóbicos: Phe, Leu, Ala, Val, Gly, Pro, Met e Ile (38,58 g/100g de proteína), presentes no HPSQ se aproxima do resultado obtido por Ng et al. (2013), com o hidrolisado da torta de óleo de dendê (47,46 g/99,06g de proteína) e Alashi et al (2014), com hidrolisado de canola (40,3g/100g de proteína).

Aminoácidos com resíduos aromáticos, tais como Phe (4,72 g/100g de proteína) e Tyr (4,71 g/100g de proteína) presentes no HPSQ, convertem radicais livres em moléculas estáveis através da doação de elétrons (Sarmadi & Ismail, 2010). Lys (7,54 g/100g de proteína) e Leu (6,42g/100g de proteína) também são descritos na literatura por sua atividade antioxidante, portanto, a maioria dos aminoácidos possui capacidade antioxidante, sendo uma alternativa viável contra as espécies de radicais livres (Erdmann, Cheung, & Schröder 2008). Dessa maneira, o total destes aminoácidos apresentados no hidrolisado, pode estar relacionado com a capacidade antioxidante do HPSQ obtido neste estudo.

3.3.2 Composição de aminoácidos livres

A formação de aminoácidos livres reflete a efetividade da enzima utilizada no processo de hidrólise (Aguirre, Garro & de Giori, 2008). Na Tabela 4 encontra-se a composição de aminoácidos livres do HPSQ.

Tabela 4

Composição de aminoácidos livres (g/100g de proteína) do hidrolisado proteico de sementes de quiabo (HPSQ)

Aminoácidos Livres (g/100g de ptn)	Símbolo	HPSQ
Aspártico	Asp	0,10±0,006
Ácido glutâmico	Glu	0,28±0,010
Serina	Ser	0,22±0,006
Glicina	Gly	0,05±0,012
Histidina	His	0,21±0,006
Arginina	Arg	0,73±0,012
Treonina	Thr	0,38±0,006
Alanina	Ala	0,07±0,010
Prolina	Pro	0,06±0,006
Tirosina	Tyr	0,53±0,006
Valina	Val	0,30±0,025
Metionina	Met	0,49±0,021
Cistina	Cys	0,28±0,006
Isoleucina	Ile	0,41±0,017
Leucina	Leu	1,10±0,030
Fenilalanina	Phe	1,45±0,031
Lisina	Lys	0,75±0,015
Total		7,42±0,46

Média ± desvio padrão de três repetições

Conforme descrito por Yang, Yang, Li, Li, Jiang, (2011), a enzima Alcalase® hidrolisa preferencialmente o lado carboxil das ligações peptídicas dos aminoácidos: ácido glutâmico, glutamina, metionina, leucina, tirosina e lisina. De acordo com os dados apresentados (Tab. 3), verifica-se após o processo de hidrólise teores dos aminoácidos Glu, Met, Thr, Leu e Lys de 0,28; 0,49; 0,38; 1,10 e 0,75 g/100g de proteína, respectivamente, comprovando a efetividade da enzima na clivagem das ligações peptídicas nas condições empregadas no processo hidrolítico. Segundo Nielsen, Petersen e Dammbmann (2001), a maior

proporção de aminoácidos livres está relacionada ao maior grau de hidrólise e formação de peptídeos de menor massa molecular.

4. Perfil eletroforético

A eletroforese (SDS-PAGE-Tricina) do CPSQ e do HPSQ está apresentada na Figura 1.

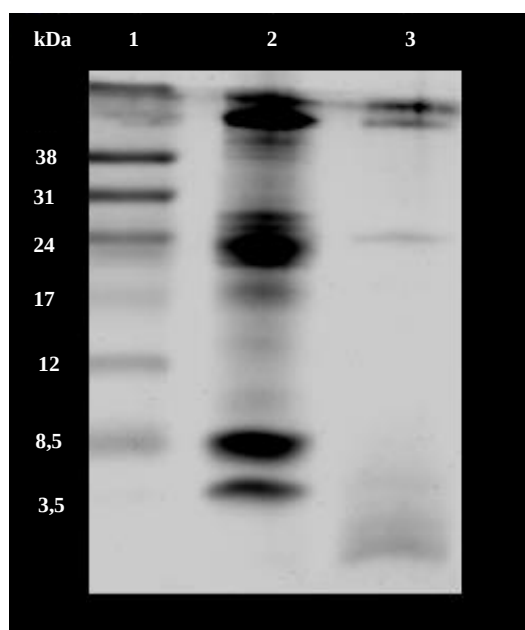


Fig. 1. Perfil eletroforético (SDS/PAGE- Tricina) do CPSQ e HPSQ (1) marcador molecular GE, (2) CPSQ (76g de ptn/100g de amostra) e (3) HPSQ (65,13g de ptn/100g de amostra) (Grau de hidrólise:19,32%).

De acordo com a Figura 1, observa-se que o CPSQ em SDS-Tricina (poço 2) apresenta bandas na faixa acima de massa molecular de 38 e abaixo de 8,5 kDa. Após hidrólise com Alcalase®, observa-se que a enzima foi capaz de clivar a maioria das bandas proteicas do CPSQ, restando bandas proteicas pouco evidentes com massa molecular acima de 38 kDa e próximo a 24 kDa que foram resistentes a hidrólise enzimática. No entanto, ressalta-se o aparecimento de bandas peptídicas abaixo de 3,5 kDa no HPSQ (poço 3). Esses resultados sugerem que os peptídeos com massa molecular abaixo de 3,5 kDa podem ter sido responsáveis pela atividade antioxidante do HPSQ, estando em concordância com o estudo de Esteve, Marina & Garcia (2015), com hidrolisado de sementes de oliva e suas frações peptídicas (> 5, 5-3 e < 3 kDa), cuja atividade para eliminação do radical ABTS foi superior para fração < 3 kDa, bem como no estudo de Tironi e Anon (2010), com hidrolisado e frações

peptídicas de amarantho, que mostraram maior atividade para as moléculas com peso molecular <0,5 kDa.

4. Conclusões

Esse estudo mostrou considerável teor de proteína recuperada no CPSQ utilizado para hidrólise enzimática. O HSPQ apresentou atividade antioxidante mais elevada que o CPSQ, comprovando a necessidade de hidrólise para liberação de peptídeos bioativos da matriz proteica. O perfil eletroforético revelou efetividade da hidrólise utilizando Alcalase®, com geração de pequenos peptídeos que são relatados na literatura com capacidade de eliminação de radicais livres.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), pelo apoio financeiro.

Referências

- Adler-Nissen, J. (1986). Enzymic hydrolysis of food protein. London: Elsevier Applied Science Publishers.
- Aguirre, M.S., Garro, G.S. , & De Giori. (2008). Enzymatic hydrolysis of soybean protein using lactic acid bacteria. *Food Chemistry*, 111, 976–982.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemistry. (2005). Official Methods of Analysis. Washington D.C.: AOAC International.
- Bligh E.G, Dyer W.J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*, 37, 911–917.
- Chen, C., Chi, Y.-J., Zhao, M.-Y., & Lv, L. (2012). Purification and identification of antioxidant peptides from egg white protein hydrolysate *Amino Acids*, 43, 457–466.
- Chen, N., Yang, H., Sun, Y., Niu, J., & Liu, S. (2012). Purification and identification of antioxidant peptides from walnut (*Juglans regia* L.) protein hydrolysates. *Peptides*, 38(2), 344–9.
- Elias, R. J., Kellerby, S. S., & Decker, E. A. (2008). Antioxidant Activity Of Proteins And Peptides. *Critical Reviews. Food Science And Nutrition*, 48, (5), 430 – 441.

- Erdmann, K., Cheung, Y. B. W., & Schröder, H. (2008). The possible roles of food derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 19, 643-654.
- Esteve, C., Marina, M.L., & García, M.C. (2015). Novel strategy for the revalorization of olive (*Olea europaea*) residues based on the extraction of bioactive peptides. *Food Chemistry*, 167, 272–280.
- Evans, J.L., Goldfine, I.D., Maddux, B.A., & Grodsky, G.M. (2003). Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and β -cell dysfunction? *Diabetes*, 52, 1–8.
- Hagen, S. R., Frost, B., & Augustin, J. (1989). Pre-column phenylisothiocyanate derivatization and liquid chromatography of amino acids in food. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 72, 912- 916.
- Halliwel, B.(2013). The antioxidant paradox: Less paradoxical now? *British Journal of Clinical Pharmacology*, 75 (3), 637–644.
- Jamdar, S. N., Rajalakshmi, V., Pednekar, M. D., Juan, F., Yardi, V., & Sharma, A. (2010). Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate. *Food Chemistry*, 121(1), 178–184.
- Jarret, R.L., Wang, M.L., & Levy, I.J. (2011). Seed oil and fatty acid content in okra (*Abelmoschus esculentus*) and related species. *J. Agric. Food Chemistry*, 59, 4019–4024.
- Je, J.Y., Qian, Z.J., Byun, H.G., & Kim, S.K. (2007). Purification and characterization of n antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. *Process Biochem*, 42, 840–6.
- Johansen, J.S., Harris, A.K., Rychly, D.J., & Ergul, A. (2005). Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. *Cardiovasc Diabetol*, 4-5.
- Kanner, J., Gorelik, S., Roman, S., & Kohen, R. (2012).Protection by polyphenols of postprandial human plasma and low density lipoprotein modification: The stomach as a bioreactor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, (36), 8790–8796.
- Nielsen, P.M., Petersen, D. & Dambmann, C. (2001). Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *J. Food Sci.*, 66, 642–646.
- Matsuda, M., & Shimomura, I. (2013). Increased oxidative stress in obesity: Implications for metabolic syndrome, diabetes, hypertension, dyslipidemia, atherosclerosis, and cancer. *Obesity Research and Clinical Practice*, 7, e330–e341.
- Mcdonald-Wicks L.K, Wood L.G, & Garg M.L.(2006). Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. *J Sci Food Agric*. 86, 2046–2056.
- Megías, C., Pedroche, J., Yust, M.M., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Millán, F., & Vioque, J. (2008). Production of copper-chelating peptides after hydrolysis of sunflower proteins

- with pepsin and pancreatin. *LWT - Food Science and Technology*, v. 41, n. 10, p. 1973–1977.
- Morales, F.J., & Jimenez-Perez, S., 2001, Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to colour and fluorescence. *Food Chemistry*, 72, 119–125.
- Ng, K. L., Ayoba, M. K., Saida, M. S., Osman^b, M. A., & Ismail^c, A. (2013). Optimization of enzymatic hydrolysis of palm kernel cake protein (PKCP) for producing hydrolysates with antiradical capacity. *Industrial Crops and Products*, 43, 725– 731.
- Prieto P, Pineda M, & Aguilar M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal Biochem*, 269, 337-341.
- Polanco-Lugo, E., Dávila-Ortiz, G., Betancur-Ancona, D. A., Chel-Guerrero, L. A. (2014). Effects of sequential enzymatic hydrolysis on structural, bioactive and functional properties of Phaseolus lunatus protein isolate. *Food Science and Technology*, 34, 441-448.
- Sandoval-Oliveros, M.R. & Paredes-López, O. (2013). Isolation and Characterization of Proteins from Chia Seeds (*Salvia hispanica* L.). *Journal of Agric. Food Chemistry*. 61, 193–201.
- Sarmadi, B. H., & Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: a review. *Peptides*, 31(10), 1949–56.
- Schagger, H., & van Jagow (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, 166, 368– 379.
- Tironi, V. A., & Anon, M. C. (2010). Amaranth proteins as a source of antioxidant peptides: Effect of proteolysis. *Food Research International*, 43, 315–322.
- Tömösközi, S., Lásztity, R., Haraszi, R., & Baticz, O. (2001). Isolation and study of the functional properties of pea proteins. *Nahrung*, 45, (6), 399-401.
- Udenigwe, C. C., & Aluko, R. E. (2011). Chemometric analysis of the amino acid requirements of antioxidant food protein hydrolysates. *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 3148–3161.
- Valdez-Ortiz, A., Fuentes-Gutiérrez, C.I., Germán-Báez, L.J. , Gutiérrez-Dorado, R. , & Medina-Godoy, R. (2012). Protein hydrolysates obtained from Azufrado (sulphur yellow) beans (*Phaseolus vulgaris*): Nutritional, ACE-inhibitory and antioxidative characterization. *LWT - Food Science and Technology*, 46, 91-96.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J. Biochem Cell Biol*, 39, 44–84.

- Wang, Q.-K, Li, W., He, Y.-H., Ren, D.-D., Kow, F., Song, L.-L., & Yu, X.-J. (2014). Novel antioxidative peptides from the protein hydrolysate of oysters (*Crassostrea talienwhanensis*) *Food Chemistry*, 145, 991–996.
- White, J. A., Hart, R. J., & Fry, J. C. (1986). An evaluation of the Waters Pico-Tag system for the amino-acid analysis of food materials. *Journal of Automatic Chemistry*, 8, 170-177.
- Wiriyanphan, C., Chitsomboon, B., & Yongsawadigul, J. (2012). Antioxidant activity of protein hydrolysates derived from threadfin bream surimi byproducts. *Food Chemistry*, 132, 104–111.
- Yang, B., Yang, H., Li, J., Li, Z., Jiang, Y. (2011). Amino acid composition, molecular weight distribution and antioxidant activity of protein hydrolysates of soy sauce lees. *Food Chemistry*, 124,(2), 551-555.
- Zhang T, Li Y, Miao M, & Jiang B. (2011). Purification and characterisation of a new antioxidant peptide from chickpea (*Cicer arietium* L.) protein hydrolysates. *Food Chemistry*. 128, 28-33.
- Zhao, Q., Xiong, H., Selomulya, C., Chen, X. D., Zhong, H., Wang, S., et al. (2012). Enzymatic hydrolysis of rice dreg protein: Effects of enzyme type on the functional properties and antioxidant activities of recovered proteins. *Food Chemistry*, 134, 1360–1367.
- Zhuang, H., Tang, N, & Yuan. Y. (2013). Purification and identification of antioxidant peptides from corn gluten meal. *Journal of Functional Foods*, 5, 1810–1821

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste estudo indicam que, nos níveis estudados no DCCR o hidrolisado (H4) encontra-se dentro da faixa ótima para as variáveis independentes (concentração enzimática e tempo de hidrólise) para se obter as melhores condições do processo de hidrólise, visando minimizar os custos e o tempo de hidrólise na obtenção de hidrolisado com capacidade antioxidante.

O concentrado proteico de sementes de quiabo (CPSQ) apresentou menor capacidade antioxidante total e sequestrante dos radicais ABTS e DPPH quando comparado aos hidrolisados proteicos obtidos, sugerindo a necessidade da hidrólise para liberação de peptídeos bioativos da matriz proteica.

A partir do CPSQ, obteve-se um hidrolisado ótimo com a presença de peptídeos de baixo peso molecular, teores consideráveis de aminoácidos aromáticos, hidrofóbicos e ácidos que são relatados na literatura com potencial de interagir com os radicais livres, doando prótons e elétrons e neutralizando-os. Os resultados sugerem que a atividade encontrada pode estar relacionada com esses fragmentos proteicos.

Esses resultados indicam que o produto obtido poderá vir a ser utilizado como ingrediente no desenvolvimento de alimentos funcionais, devido a sua capacidade como antioxidante natural. No entanto, outros estudos são necessários para avaliar os efeitos que o hidrolisado pode produzir *in vivo*, no intuito de constatar a efetividade da atividade antioxidante no organismo humano.