

<https://doi.org/10.31533/pubvet.v13n3a293.1-9>

## Potencial biológico e estudo *in vitro* da digestão de peptídeos solúveis obtidos de diferentes variedades de queijo

Wellington Leal dos Santos<sup>1</sup>, Euzanyr Gomes da Silva<sup>2</sup>, Maria Emília Brito da Silva<sup>3</sup>, Edson Flávio Teixeira da Silva<sup>3</sup>, Keila Aparecida Moreira<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>Doutorado em Biociência Animal, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife – PE, Brasil.

<sup>2</sup>Mestrado em Produção Agrícola, Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Garanhuns – PE, Brasil.

<sup>3</sup>Mestrado em Biociência Animal, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife – PE, Brasil.

<sup>4</sup>Professora da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Garanhuns, Garanhuns – PE, Brasil.

\*Autor para correspondência, E-mail: [moreirakeila@hotmail.com](mailto:moreirakeila@hotmail.com)

**Resumo.** Atualmente, a preocupação com a qualidade de vida tem elevado o consumo de alimentos promotores de saúde, sendo assim, pesquisas em busca de compostos naturais que exerçam atividade biológica se intensificaram na última década. Objetivou-se avaliar as atividades antioxidantes, quelante de íons  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$ , anti-hipertensiva de proteínas e peptídeos hidrossolúveis dos queijos de coalho bubalino e bovino, gorgonzola, mussarela, cheddar e ricota. As atividades antioxidantes foram realizadas empregando os radicais  $\text{ABTS}^{+\cdot}$  (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) e  $\text{DPPH}^{\cdot}$  (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), os íons  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$  foram utilizados para a atividade quelante e o substrato FAPGG (N-[3-(2-furil) acrilóil]-L-fenilalanina-glicil-glicina) foi utilizado para avaliar a inibição da enzima conversora de angiotensina. As proteínas e peptídeos solúveis em água oriundos das diferentes variedades de queijo apresentaram capacidade de eliminação dos radicais  $\text{ABTS}^{+\cdot}$  e  $\text{DPPH}^{\cdot}$  superior a 50% e 80%, respectivamente. A quelação dos íons  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$  apresentou-se entre 1% e 70% variando de acordo com o tipo de queijo. O potencial inibitório de atividade inibitória da enzima conversora de angiotensina dos extratos aquosos contendo os pequenos fragmentos proteicos encontra-se entre 8% e 50% antes e após ação das enzimas do trato gastrointestinal. Sendo assim, os queijos analisados apresentam potencialidade para serem empregados como alimentos funcionais devido à multifuncionalidade biológica apresentada pelas proteínas e peptídeos extraídos.

**Palavras chave:** alimento funcional, antioxidante, anti-hipertensivo, peptídeos bioativos

### *Biological potential and in vitro study of the digestion of soluble peptides of different varieties of cheese*

**Abstract.** Currently, the concern with quality of life has raised the consumption of health food promoters, and therefore, research in search of natural compounds that exercise biological activity have intensified in the last decade. The objective was to evaluate the antioxidant activities, chelating  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$  ions, antihypertensive proteins and water-soluble peptides of buffalo and bovine rennet cheeses, gorgonzola, mozzarella, cheddar and ricotta. The antioxidant activities were performed using the radicals  $\text{ABTS}^{+\cdot}$  (2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) and  $\text{DPPH}^{\cdot}$  (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl),  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$  ions were used for chelating activity and the substrate FAPGG (N-[3-(2-furyl) acryloyl] -L-phenylalanine-glycyl-glycine) was used to evaluate the inhibition of angiotensin converting enzyme. The water-soluble proteins and peptides from the different varieties of cheese had the capacity to eliminate  $\text{ABTS}^{+\cdot}$  and  $\text{DPPH}^{\cdot}$  radicals higher than 50% and 80%, respectively. The chelation of the  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$  ions occurred between 1%

and 70%, depending on the type of cheese. The ACE inhibitory potential of the aqueous extracts containing the small protein fragments is between 8% and 50% before and after the action of the enzymes of the gastrointestinal tract. Thus, the cheeses analyzed have the potential to be used as functional foods due to the biological multifunctionality presented by proteins and peptides extracted.

**Keywords:** antihypertensive, antioxidante, bioactivepeptides, functionalfood

## ***Potencial biológico y estudio in vitro de la digestión de péptidos solubles de diferentes variedades de queso***

**Resumen.** En la actualidad, la preocupación por la calidad de vida ha elevado el consumo de alimentos promotores de salud, siendo así, investigaciones en busca de compuestos naturales que ejerzan actividad biológica se han intensificado en la última década. Se evaluaron las actividades antioxidantes, quelantes de iones  $Fe^{2+}$  y  $Cu^{2+}$ , anti-hipertensiva de proteínas y péptidos hidrosolubles de los quesos de cuajo bufalino y bovino, gorgonzola, mozzarella, cheddar y ricota. Las actividades antioxidantes se realizaron empleando los radicales  $ABTS^{+}$  (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) e  $DPPH^{\bullet}$  (2,2-difenil-1-picrilo-hidrazila), los iones  $Fe^{2+}$  y  $Cu^{2+}$  fueron utilizados para la actividad quelante y el sustrato FAPGG (N- [3- (2-furil) acrilolil] -L-fenilalanina-glicil-glicina) se utilizó para evaluar la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina. Las proteínas y péptidos solubles en agua procedentes de las diferentes variedades de queso presentaron capacidad de eliminación de los radicales  $ABTS^{+}$  y  $DPPH^{\bullet}$  superior al 50% y 80%, respectivamente. La quelación de los iones  $Fe^{2+}$  y  $Cu^{2+}$  se presentó entre el 1% y el 70% variando de acuerdo con el tipo de queso. El potencial inhibitorio de ECA de los extractos acuosos que contienen los pequeños fragmentos proteicos se encuentra entre 8% y 50% antes y después de la acción de las enzimas del tracto gastrointestinal. Siendo así, los quesos analizados presentan potencialidad para ser empleados como alimentos funcionales debido a la multifuncionalidad biológica presentada por las proteínas y péptidos extraídos.

**Palabras clave:** alimento funcional, antioxidante, antihipertensivo, péptidos bioactivos

### **Introdução**

O aumento no número de indivíduos com doenças crônicas como a hipertensão arterial, a diabetes, as neoplasias, dentre outras, têm elevado o consumo de alimentos promotores de saúde. Esses alimentos são capazes de liberar substâncias que ajudam na melhoria da qualidade de vida pelo controle ou do impedimento da instalação de processos patológicos. Diante disso, tem se intensificado a busca por compostos naturais biologicamente ativos, substâncias que fazem parte da constituição dos alimentos e que, quando ingeridos participam de atividades fisiológicas e metabólicas no organismo (Amorati et al., 2013). Dentre esses compostos naturais destacam-se os peptídeos bioativos, pequenos fragmentos de proteínas, normalmente entre 2 a 20 aminoácidos, que quando presentes na estrutura original estão inativados, sendo necessário processo externo para que sejam ativados, vindo a desenvolver modificações/modulações no organismo, apresentando propriedades multifuncionais (Lorenzo et al., 2018; Raikos & Dassios, 2014; Ryan et al., 2011). Esses pequenos fragmentos proteicos foram isolados dos mais diversos produtos lácteos, dentre eles, queijo, kefir, iogurte e bebida fermentada. A liberação destas moléculas proteicas pode ocorrer *in vivo* por meio da hidrólise enzimática durante o processo digestivo *in vitro* através das culturas iniciadoras, ou ainda por proteólise via enzimas derivadas de microrganismos ou plantas (Pritchard et al., 2010).

Existe uma gama de aplicações para os peptídeos de origem láctea, podendo se destacar as atividades antimicrobiana, antifúngica, antiviral, antitumoral (Shori & Baba, 2015), capacidade de ligação com minerais, atividade anti-hipertensiva diretamente relacionada a capacidade de inibição da enzima conversora de angiotensina e a antioxidante, anticancerígena, opioides, anti-obesidade (Espitia et al., 2012).

Sendo assim, objetivou-se com este trabalho avaliar as propriedades antioxidantes, quelante de  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{2+}$  e inibitória da enzima conversora de angiotensina I de extratos peptídicos solúveis em água de diferentes tipos de queijo antes e após a simulação da digestão gastrointestinal *in vitro*.

## Material e métodos

### Obtenção dos queijos

As amostras dos queijos coalho bubalino, bovino, gorgonzola, ricota, cheddar e mussarela bovinos foram obtidos diretamente dos produtores e/ou estabelecimentos comerciais. Após as coletas os queijos foram acondicionados em caixa de isopor, identificados e mantidos sob refrigeração e transportados até o Laboratório de Biotecnologia – Central de Laboratórios de Garanhuns da Unidade Acadêmica de Garanhuns/UFRPE. Posteriormente, pesou-se 30 gramas de cada variedade de queijo para obtenção dos peptídeos solúveis em água empregando metodologia recomendada por Rizzello et al. (2005) e Silva et al. (2012).

### Extração de proteínas e peptídeos bioativos solúveis em água

A extração das proteínas e peptídeos solúveis em água foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Rizzello et al. (2005) e Silva et al. (2012) com algumas modificações. Trinta gramas de queijo foram triturados e homogeneizados com água (1:3 m/v) por 10 minutos. Em seguida, a suspensão foi mantida por 1 hora em banho-maria a 40 °C objetivando liquefazer a gordura, posteriormente centrifugada a 3000 xg por 30 min a 4 °C. Após a centrifugação descartou-se a camada superior de gordura e o sobrenadante foi filtrado em papel de filtro quantitativo e posteriormente, com filtro Millex-HA 0,45µm (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha). O filtrado foi congelado para posteriores análises.

### Simulação de digestão

O processo de digestão *in vitro* foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Martos et al. (2010), com modificações. Para a simulação de digestão gástrica, soluções aquosas contendo proteínas e peptídeos (6,0 mg.mL<sup>-1</sup>) obtidos dos diferentes tipos de queijo foram adicionadas a 1 mL de 3,5 mmol L<sup>-1</sup> NaCl, e o pH ajustado para 2 com HCl 1 M. Essa mistura foi incubada em agitador orbital a 37 °C por 15 minutos a 100 rpm. Posteriormente, adicionou-se 1 mL de pepsina (5 mg.mL<sup>-1</sup>) e o pH foi novamente ajustado para 2 empregado HCl 1M, permanecendo em agitador orbital, por 1 hora, sob as condições descritas anteriormente.

Para a digestão a nível intestinal ajustou-se o pH para 6,5 empregando NaHCO<sub>3</sub> 1 M e adicionando 1 mL de CaCl<sub>2</sub> 1 M e 1 mL de sais biliares (9 mg.mL<sup>-1</sup>). Essa solução permaneceu em agitador orbital a 37 °C a 100 rpm por 15 minutos. Decorrido este tempo foi adicionado 1 mL de pancreatina (10 mg.mL<sup>-1</sup>) e 4 mL de água deionizada. A mistura reacional permaneceu sob agitação a 37 °C por 60 minutos a 100 rpm, interrompida por aquecimento em banho termostatizado a 90 °C por 10 minutos, centrifugado a 5000 xg por 20 minutos e o sobrenadante congelado para análises posteriores.

### Ensaio de atividade sequestradora dos radicais livres das proteínas e peptídeos obtidos dos diferentes tipos de queijo

#### Atividade de eliminação do radical ABTS<sup>+</sup>

A atividade antioxidante das proteínas e peptídeos solúveis em água foi determinada empregando o radical ABTS<sup>+</sup>, de acordo com a metodologia descrita por Re et al. (1999), com modificações. Esse radical é gerado a partir de 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico (ABTS). Para formação do radical, emprega-se uma solução formada por ABTS<sup>+</sup> e persulfato de potássio a uma concentração final de 7 e 2,45 mM, respectivamente, e posterior incubação da solução por 16h a 30 °C. Transcorrido esse período a solução contendo o radical ABTS<sup>+</sup> foi ajustada para uma absorvância de 0,700 ± 0,020 a 734 nm em espectrofotômetro. Para reação, utilizou-se 50 µL da solução de proteínas e peptídeos solúveis em água (1 mg.mL<sup>-1</sup>), antes e após o processo de digestão *in vitro*, e 950 µL da solução contendo o radical ABTS. Os ensaios foram realizados em triplicatas, incubados a 30 °C por seis minutos e lidos em espectrofotômetro a 734 nm. A atividade antioxidante (%) foi calculada segundo a equação 1 e

expressa atividade em eliminação do radical. O controle negativo continha solução tampão fosfato de sódio, pH 7,4, 100 mM em substituição a amostra.

$$\text{Atividade antioxidante (\%)} = \left[ \frac{(A_{\text{Controle}} - A_{\text{Amostra}})}{A_{\text{Controle}}} \right] * 100 \quad \text{(Equação 1)}$$

Onde,  $A_{\text{Controle}}$  é a D.O. do controle negativo e  $A_{\text{Amostra}}$  é o D.O. da amostra.

### Atividade de eliminação do radical DPPH

Os ensaios de eliminação do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) foi realizada de acordo com o método descrito por Li et al. (2013), com modificações. O preparo da solução de DPPH (2 mM) ocorreu minutos antes da realização da atividade antioxidante empregando etanol a 70%. Empregou-se 500  $\mu\text{L}$  da solução de DPPH e 500  $\mu\text{L}$  da amostra (1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  das proteínas e peptídeos), e após homogeneização, a solução formada foi mantida ao abrigo da luz por 30 minutos. A absorbância das amostras foi determinada a 517 nm. Como controle positivo utilizou-se ácido ascórbico substituindo a amostra e como controle negativo, empregado no cálculo, etanol a 70%. A determinação da atividade antioxidante em relação a eliminação do radical DPPH foi determinada de acordo com a equação abaixo.

$$\text{Atividade antioxidante (\%)} = \left[ \frac{(A_{\text{Controle}} - A_{\text{Amostra}})}{A_{\text{Controle}}} \right] * 100 \quad \text{(Equação 2)}$$

Onde,  $A_{\text{Controle}}$  é a D.O. do controle negativo e  $A_{\text{Amostra}}$  é o D.O. da amostra.

### Avaliação da atividade quelante de $\text{Cu}^{2+}$ e $\text{Fe}^{2+}$ de proteínas e peptídeos solúveis

A atividade quelante de ferro foi realizada de acordo com a metodologia descrita em Sánchez-Vioque et al. (2013), com modificações. Empregou-se 125  $\mu\text{L}$  da solução de peptídeos e proteínas (1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), antes e após a simulação de digestão *in vitro*, homogeneizados com 0,5 mL de tampão acetato de sódio (0,1 M e pH 4,9) e a 12,5  $\mu\text{L}$  de solução  $\text{Fe}^{2+}$  (2 mM). Após 30 minutos de incubação, foi adicionado 50  $\mu\text{L}$  de solução ferrozina (5 mM), aguardou-se mais 30 minutos, e posteriormente, realizou-se leitura a 562 nm (Carter, 1971).

A atividade quelante de cobre foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Gil-Chávez et al. (2013) com modificações, utilizou-se 500  $\mu\text{L}$  de tampão acetato de sódio (50 mM e pH 6,0) adicionado a 12,5  $\mu\text{L}$  de solução de  $\text{CuSO}_4$  (5 mM) e a 125  $\mu\text{L}$  da solução contendo os peptídeos e proteínas (1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) antes e após a simulação de digestão *in vitro*. Essa mistura foi incubada por 30 minutos e, em seguida, foi adicionado 12,5  $\mu\text{L}$  da solução de violeta de pirocatecol (4 mM). Após 30 minutos de incubação, a mistura foi lida a 632 nm.

Em ambas as atividades o controle negativo foi realizado empregando-se água, enquanto o controle positivo foi realizado com solução de EDTA (0,045%). Para determinar a porcentagem de quelação dos íons, empregou-se a equação descrita a baixo:

$$(\%) \text{ Quelação} = \left[ \frac{(A_0 - A_1)}{A_0} \right] * 100 \quad \text{(Equação 3)}$$

Onde:  $A_0$  = D.O. controle negativo;  $A_1$  = D.O. amostra.

### Atividade inibitória da enzima conversora de angiotensina (ECA)

Os ensaios das atividades inibitórias da enzima conversora de angiotensina (ECA) foram realizados com base no método descrito por Holmquist et al. (1979) empregando FAPGG (N-[3-(2-furil) acriloil]-L-fenilalanina-glicil-glicina) como substrato com algumas modificações na metodologia. O ensaio foi realizado em placa de 96 poços de fundo plano e de poliestireno (Corning®). Para a realização do teste empregou-se uma mistura composta por: 5,5  $\mu\text{L}$  de ECA (50  $\text{mU}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), 12,5  $\mu\text{L}$  das proteínas e peptídeos solúveis em água, antes e após a simulação de digestão *in vitro*, 25  $\mu\text{L}$  de FAPGG (0,5 mM), 37,5  $\mu\text{L}$  de tampão Tris-HCl pH 7,5 50 mM (0,3 M NaCl e 1 mM de  $\text{ZnCl}_2$ ). O controle positivo foi realizado contendo o tampão ECA (Tris-HCl 50 mM pH 7,5 NaCl 0,3M  $\text{ZnCl}_2$  1 mM) no lugar da amostra. O monitoramento da reação ocorreu a 340 nm por 60 minutos, sendo lida no tempo zero e após uma hora. Determinou-se a atividade inibitória da enzima conversora de angiotensina comparando a absorbância do controle e da amostra no tempo zero decorrido 60 minutos, de acordo com a equação:

$$\text{Inibição ECA \%} = \left[ 1 - \frac{\Delta A_{\text{Inibição}}}{\Delta A_{\text{Controle}}} \right] * 100 \text{ (Equação 4)}$$

Onde,  $\Delta A_{\text{Inibição}}$  e  $\Delta A_{\text{Controle}}$  é a diferença entre a leitura da atividade no tempo zero e após decorrido os 60 minutos para as amostras e o controle, respectivamente

### Análise estatística

Os resultados obtidos nos ensaios foram submetidos à análise de variância (ANOVA), utilizando o software *Assistat 7.7 versão beta* (INPI, Campina Grande, PB, Brasil) para verificar se os tratamentos foram significativos estatisticamente ( $P < 0,01$ ). A comparação de médias foi realizada pelo teste de *Tukey* ao nível de 5% de probabilidade ( $P < 0,05$ ), utilizando o mesmo programa. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas.

### Resultados

O potencial antioxidante relativo a eliminação do radical ABTS<sup>•+</sup> antes do processo digestório dos peptídeos obtidos dos diferentes tipos de queijo apresentou-se entre  $0,00 \pm 0,51\%$  e  $93,61 \pm 0,63\%$ . Destacando-se os peptídeos obtidos do queijo de coalho bovino, mussarela e gorgonzola, com atividade superior a 80% (Tabela 1).

A simulação do processo digestivo exibiu atividades antioxidantes entre  $23,54 \pm 0,58$  e  $98,93 \pm 0,29\%$  (Tabela 1). Com aumento na atividade antioxidante das proteínas e peptídeos obtidos a partir dos queijos tipo cheddar e gorgonzola. As ações proteolíticas das enzimas digestivas foram capazes de liberar peptídeos bioativos presentes no queijo ricota que apresentou  $23,54 \pm 0,58\%$  de eliminação do radical ABTS<sup>•+</sup>. Nos peptídeos dos queijos de coalho bubalino e bovino e mussarela ocorreu diminuição da atividade antioxidante.

A atividade antioxidante em relação à eliminação do radical DPPH• variou entre  $85,83 \pm 1,02\%$  e  $99,31 \pm 0,00\%$ , antes de serem submetidos ao processo digestivo. Após o processo de digestão *in vitro* observou-se uma redução na eliminação do radical, exceto o queijo de coalho de búfala que apresentou discreto aumento no potencial antioxidante (Tabela 1).

Os peptídeos obtidos dos diferentes tipos de queijo apresentaram potencial quelante ferro entre  $1,23 \pm 1,21\%$  e  $72,41 \pm 3,02\%$  demonstrando que todos os tipos de queijo testados apresentam peptídeos capazes de ligar-se ao íon metálico férrico (Tabela 1). Dentre os peptídeos destacam-se aqueles obtidos do queijo de coalho bovino com potencial ligante de  $67,73 \pm 0,99\%$ . O menor potencial foi encontrado nos peptídeos provenientes do queijo ricota, entretanto, após o processo de digestão *in vitro*, foi possível observar um aumento no potencial quelante.

**Tabela 1.** Atividade antioxidante, quelante de ferro e cobre das proteínas e peptídeos solúveis em água dos diferentes tipos de queijo antes e após a simulação da digestão *in vitro*.

Amostra	ABTS (%)		DPPH (%)		Quelante de Fe <sup>2+</sup> (%)		Quelante de Cu <sup>2+</sup> (%)	
	Antes da digestão	Pós – digestão	Antes da digestão	Pós –digestão	Antes da digestão	Pós –digestão	Antes da digestão	Pós – digestão
<b>CHED</b>	51,61±0,96 <sup>dA</sup>	54,03±0,48 <sup>cA</sup>	99,31±0,00 <sup>aA</sup>	87,61±0,15 <sup>aA</sup>	72,41±3,02 <sup>bA</sup>	9,12±9,96 <sup>adB</sup>	26,12±0,34 <sup>eA</sup>	57,41±7,34 <sup>cB</sup>
<b>CBOV</b>	93,61±0,63 <sup>hA</sup>	38,54±1,83 <sup>deB</sup>	86,20±1,18 <sup>deA</sup>	87,74±0,55 <sup>aA</sup>	67,73±0,99 <sup>bcB</sup>	16,25±3,04 <sup>cdA</sup>	14,98±1,54 <sup>EA</sup>	87,06±4,34 <sup>feB</sup>
<b>CBUB</b>	52,10±3,97 <sup>dA</sup>	43,19±2,61 <sup>dA</sup>	88,47±0,06 <sup>cdB</sup>	86,76±0,00 <sup>ahA</sup>	20,84±7,20 <sup>fA</sup>	51,04±1,67 <sup>hB</sup>	74,74±0,44 <sup>hA</sup>	74,82±1,64 <sup>hA</sup>
<b>GORG</b>	90,84±1,61 <sup>bcB</sup>	98,93±0,29 <sup>aB</sup>	85,83±1,02 <sup>aB</sup>	85,51±0,25 <sup>hB</sup>	59,74±0,56 <sup>cdA</sup>	16,99±0,52 <sup>cdB</sup>	41,33±1,54 <sup>dA</sup>	33,65±3,94 <sup>dB</sup>
<b>MINA</b>	86,13±0,95 <sup>cA</sup>	63,23±1,16 <sup>hB</sup>	95,97±0,62 <sup>hA</sup>	86,37±0,15 <sup>ahB</sup>	34,22±0,29 <sup>eB</sup>	5,34±1,67 <sup>dA</sup>	1,02±3,04 <sup>gA</sup>	15,29±2,34 <sup>efB</sup>
<b>MUSS</b>	90,00±0,14 <sup>bcA</sup>	33,61±2,51 <sup>eB</sup>	95,41±0,06 <sup>hA</sup>	85,90±0,65 <sup>hB</sup>	55,10±2,34 <sup>dA</sup>	10,53±5,87 <sup>cdB</sup>	51,60±4,34 <sup>cB</sup>	17,88±0,64 <sup>efA</sup>
<b>RICO</b>	0,00±0,51 <sup>cB</sup>	23,54±0,58 <sup>fA</sup>	90,14±0,00 <sup>cA</sup>	85,86±0,15 <sup>hB</sup>	1,23±1,21 <sup>gA</sup>	22,92±1,57 <sup>cB</sup>	29,64±1,64 <sup>eA</sup>	20,82±1,84 <sup>cB</sup>

Letras minúscula diferentes, na mesma linha, para uma mesma atividade, diferem entre si ( $p > 0,05$ ). Letra maiúscula, na mesma coluna, diferem entre si. CHED – Queijo cheddar; CBOV – Queijo coalho; CBUB – Queijo coalho bubalino; GORG – Queijo gorgonzola; MINA – Queijo minas; MUSS – Queijo mussarela; RICO – Queijo ricota.

As proteínas e peptídeos solúveis em água proveniente dos sete tipos de queijo apresentaram entre  $1,02 \pm 3,04\%$  e  $74,74 \pm 0,44\%$  de quelação de cobre antes de serem submetidos ao processo de digestão estomacal e intestinal, o que demonstra uma capacidade ligante de cobre relativamente significante. Os

peptídeos oriundos dos queijos de coalho bubalino, gorgonzola e mussarela apresentaram potencial quelante para o íon metálico  $\text{Cu}^{2+}$  em torno de 70%, 40% e 50%, respectivamente (Tabela 1). Houve um aumento significativo na capacidade quelante dos extratos proteicos provenientes dos queijos de coalho bovino e cheddar após o processo digestivo. Os peptídeos presentes nos queijos mussarelas apresentaram perda expressiva na capacidade quelante.

A atividade anti-hipertensiva apresentou variação entre  $0 \pm 0,09\%$  a  $45,46 \pm 0,01\%$  antes da simulação e  $0 \pm 0,01\%$  a  $58,93 \pm 0,01\%$  após a digestão *in vitro* (Tabela 2). Antes de serem submetidos à ação das enzimas presentes no trato gastrointestinal os peptídeos solúveis em água presentes nos queijos minas frescal, de coalho bubalino e mussarela apresentaram maior potencial de inibição da enzima conversora de angiotensina  $30,01 \pm 0,01\%$ ,  $44,47 \pm 0,01\%$ ,  $14,56 \pm 0,03\%$  e  $45,46 \pm 0,01\%$ , respectivamente. Após a simulação da digestão ocorreu decréscimo no potencial anti-hipertensivo dos queijos citados.

**Tabela 2.** Atividade inibitória da enzima conversora de angiotensina I das proteínas e peptídeos solúveis em água dos diferentes tipos de queijo antes e após a simulação da digestão *in vitro*

Amostra	Atividade inibitória de ECA antes da digestão (%)	Atividade inibitória de ECA pós-digestão (%)
<b>CHED</b>	$8,22 \pm 0,05$ <sup>a,B</sup>	$58,93 \pm 0,01$ <sup>bc, A</sup>
<b>CBOV</b>	$14,56 \pm 0,03$ <sup>c, A</sup>	$39,02 \pm 0,02$ <sup>c,B</sup>
<b>CBUB</b>	$44,47 \pm 0,01$ <sup>e, A</sup>	$8,22 \pm 0,00$ <sup>ab,B</sup>
<b>GORG</b>	$0 \pm 0,09$ <sup>b</sup>	$0 \pm 0,01$ <sup>bc</sup>
<b>MINA</b>	$30,01 \pm 0,01$ <sup>de, A</sup>	$14,16 \pm 0,00$ <sup>bc, B</sup>
<b>MUSS</b>	$45,46 \pm 0,01$ <sup>de, A</sup>	$25,35 \pm 0,02$ <sup>abc, B</sup>
<b>RICO</b>	$18,52 \pm 0,04$ <sup>cd, B</sup>	$6,73 \pm 0,00$ <sup>a, A</sup>

Letras maiúsculas diferentes, na mesma linha, para o mesmo extrato, diferem entre si ( $p > 0,05$ ). Letras minúsculas diferentes, na mesma coluna, diferem entre si ( $p < 0,05$ ). CHED – Queijo cheddar; CBOV – Queijo coalho; CBUB – Queijo coalho bubalino; GORG – Queijo gorgonzola; MINA – Queijo minas; MUSS – Queijo mussarela; RICO – Queijo ricota.

Os peptídeos presentes nos queijos cheddar e de coalho bovino apresentaram aumento do potencial anti-hipertensivo. O queijo cheddar apresentou atividade anti-hipertensiva superior a 50%.

## Discussão

Para Li et al. (2013), a presença de agentes antioxidantes desempenha papel importante na inibição da oxidação lipídica. Além disso, oferece proteção contra a ação dos radicais livres e a peroxidação dos lipídeos, que ocorre tanto em seres vivos quanto nos alimentos, estando essa capacidade de retardar os processos oxidativos e a formação de radicais livres associadas ao poder de doar elétrons, o que inativa de radicais por meio da finalização da reação em cadeia ou, simplesmente, impedindo a sua formação (Ladikos & Lougovois, 1990).

De acordo com Lehninger (2006) o aumento da atividade biológica dos peptídeos deve-se a ação das enzimas proteolíticas empregadas na simulação gástrica que atuam sobre as proteínas convertendo-os em peptídeos de dimensões reduzidas ou aminoácidos que apresentam uma maior atividade antioxidante. O processo digestivo faz com que haja ativação dos peptídeos que se encontraram inativos na molécula original, e uma vez liberados, podem exercer uma modulação das funções fisiológicas, seja por meio da interação com receptores específicos, ou indução de respostas fisiológicas (Raikos & Dassios, 2014; Ryan et al., 2011). Segundo Meisel et al. (1997) os peptídeos estão sujeitos às novas hidrólises quando submetidos a processos digestivos, podendo perder algumas características funcionais. Vale salientar que estudos avaliando a capacidade antioxidante de peptídeos solúveis em água obtidos de diferentes tipos de queijo, ainda são poucos. Os resultados alcançados neste estudo corroboram com os obtidos por Silva et al. (2012) que ao avaliar a atividade antioxidante relativa à eliminação do radical  $\text{ABTS}^{+\cdot}$  de peptídeos solúveis obtidos do queijo de coalho de diferentes localidades do agreste pernambucano, encontrou capacidade antioxidante entre  $66,27 \pm 1,24\%$  e  $84,23 \pm 0,6\%$ , com ênfase para o queijo obtido no município de Correntes. Resultados semelhantes foram encontrados por Shaiban et al. (2006) ao avaliar a capacidade antioxidante de peptídeos de queijos comerciais observando atividade antioxidante entre  $33,34 \pm 0,98\%$  e  $76,82 \pm 4,42\%$  e Meira et al. (2012)

ao avaliar pequenas cadeias proteicas de diferentes queijos uruguaios e brasileiros apresentaram atividade antioxidante entre  $32,71 \pm 1,8$  e  $81,90 \pm 0,5\%$ .

Durante o processo de digestão, *in vivo* ou *in vitro*, a atividade antioxidante apresentada pelos peptídeos pode diminuir, aumentar ou permanecer inalterada, sendo assim, o conhecimento da dinâmica da atividade antioxidante antes e após o processo digestivo faz com que seja possível a obtenção de informações que permitam inferir seu comportamento *in vivo* (Meira et al., 2012). Para Kedare & Singh (2011), Cieśła et al. (2012) e Amatatongchai et al. (2012) a capacidade antioxidante presente nos peptídeos deve-se ao poder de doação ou transferência de um átomo de hidrogênio ou um elétron para a molécula de DPPH<sup>\*</sup>, que o aceita para se tornar uma molécula estável, originando a forma reduzida DPPH-H o que ocasiona sua eliminação.

Os resultados apresentados neste estudo são superiores aos obtidos por Pritchard et al. (2010) que avaliaram o potencial bioativo dos peptídeos de origem do queijo cheddar comercial, estes autores relataram atividade antioxidante entre 7 e 14%, inferior aos encontrados nesse estudo. Meira et al. (2012) ao avaliarem a atividade de eliminação do radical DPPH<sup>\*</sup> em queijos comerciais do Paraguai e do Brasil, encontraram atividade antioxidante entre  $25,95 \pm 1,2\%$  e  $51,84 \pm 1,2\%$ . Enquanto, Hilario et al. (2010), ao trabalhar com queijo mexicano de cabras alimentadas a pasto no verão, obteve  $15,2 \pm 5,5\%$  a  $26,9 \pm 1,2\%$  de atividade antioxidante. Os resultados encontrados nos estudos anteriormente citados quando comparados ao objeto de estudo do presente estudo demonstram a alta capacidade antioxidante dos queijos produzidos e comercializados no agreste meridional pernambucano.

A ação de enzimas proteolíticas e o ambiente do trato digestório leva a ativação de peptídeos que estariam desativados na proteína original (Raikos & Dassios, 2014). Outro fato é a diminuição da atividade ligante dos peptídeos provenientes dos demais tipos de queijo que gira em torno de 70 a 85% de redução da atividade quelantes de Fe<sup>2+</sup> o que acarreta na diminuição da bioacessibilidade e biodisponibilidade do íon metálico para o organismo. E essa diminuição na atividade quelante pode estar relacionada a inatividade dos peptídeos bioativos, que segundo Torres-Fuentes et al. (2012), substâncias que apresentem capacidade de quelatar o Fe<sup>2+</sup> possuem interesse do ponto de vista nutricional, já que aumentam a absorção deste íon. Em estudo comparativo entre os peptídeos obtidos dos queijos tipo Roquefort e tipo Pecorino toscano, após 180 dias de maturação Meira et al. (2012) detectaram  $3,82 \pm 1,8\%$  e  $55,14 \pm 1,3\%$  de atividade quelante de Fe<sup>2+</sup>, respectivamente. Corrêa et al. (2014) ao avaliarem a capacidade antioxidante em soro de queijo coalho bovino observaram mínima capacidade quelante de Fe<sup>2+</sup> em cerca 13,8% e máxima em torno de 50,1%, resultados semelhantes aos encontrados no presente trabalho. Peptídeos submetidos a processos digestivos podem apresentar atividade biológica, principalmente antioxidante, diminuída, aumentada ou permanecer inalterada (Espitia et al., 2012). Os peptídeos derivados de alimentos têm mostrado importantes aplicações na prevenção de estresse oxidativo que apresentam a capacidade de ligar-se aos minerais fazendo com que ocorra um aumento a absorção *in vivo* de zinco, ferro, cobre etc Meyer et al. (2009). Além disso, há um aumento na biodisponibilidade desses íons (Tonouchi et al., 2008). Pritchard et al. (2010) afirmam que os extratos extraídos de queijos cheddar comercial apresentam potencial bioativo para inibir a ECA, principalmente após processo de maturação. Cabe destacar a ausência dos peptídeos com capacidade anti-hipertensiva no queijo tipo gorgonzola avaliada. Tonouchi et al. (2008), Meyer et al. (2009) e Ruiz et al. (2004) investigaram e relataram peptídeos com capacidade de inibir a enzima conversora de angiotensina em queijos. Além disso, Meyer et al. (2009) ao avaliarem 10 tipos de queijo tipo suíço encontraram potencial inibidor de ECA, bem como em trabalhos desenvolvidos por Dionysius et al. (2000) e Lund & Ardö (2004) que detectaram potencial bioativo em peptídeos oriundos de 13 diferentes tipos de cheddar comercial e em caseinofosfopeptídeos, também isolados de queijos.

Fontes de proteínas dotadas de capacidade inibitória de ECA têm despertado interesse, inclusive a busca por métodos que melhorem sua bioatividade para que posteriormente possam ser empregadas para formular alimentos funcionais, embora de não sejam capazes de substituir drogas comerciais, podendo ser úteis na prevenção da hipertensão (Jabeen & Aslam, 2013).

## Conclusões

Os peptídeos solúveis em água provenientes dos queijos tipo coalho bovino, coalho bubalino, cheddar, mussarela, ricota e gorgonzola oriundos de produtores rurais e de fontes comerciais

apresentaram potencial antioxidante, quelante de  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{2+}$ , tanto antes quanto após o processo da digestão *in vitro*. A presença dessas características permite o aumento do tempo de vida útil na prateleira, além possibilitar sua aplicação como alimentos funcionais, já que grande percentual dos peptídeos permanece biodisponível após o processo digestivo podendo ser facilmente empregado na prevenção de doenças ou para favorecer a absorção de metais como o cobre e o ferro.

### Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) e Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) – APQ-0460-2.01/15.

### Referências bibliográficas

- Amatatongchai, M., Laosing, S., Chailapakul, O. & Nacapricha, D. (2012). Simple flow injection for screening of total antioxidant capacity by amperometric detection of DPPH radical on carbon nanotube modified-glassy carbon electrode. *Talanta*, 97267-272.
- Amorati, R., Foti, M. C. & Valgimigli, L. (2013). Antioxidant activity of essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(46):10835-10847.
- Carter, P. (1971). Spectrophotometric determination of serum iron at the submicrogram level with a new reagent (ferrozine). *Analytical Biochemistry*, 40(2):450-458.
- Cieśla, Ł., Kryszeń, J., Stochmal, A., Oleszek, W. & Waksmundzka-Hajnos, M. (2012). Approach to develop a standardized TLC-DPPH test for assessing free radical scavenging properties of selected phenolic compounds. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 70126-135.
- Corrêa, A. P. F., Daroit, D. J., Fontoura, R., Meira, S. M. M., Segalin, J. & Brandelli, A. (2014). Hydrolysates of sheep cheese whey as a source of bioactive peptides with antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory activities. *Peptides*, 6148-55.
- Dionysius, D. A., Marschke, R. J., Wood, A. J. & Milne, J. (2000). Identification of physiologically functional peptides in dairy products. *Australian Journal of Dairy Technology*, 55(2):103.
- Espitia, P. J. P., Soares, N. F. F., Reis, J. S. C., Andrade, N. J., Cruz, R. S. & Medeiros, E. A. A. (2012). Bioactive peptides: synthesis, properties, and applications in the packaging and preservation of food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11(2):187-204.
- Gil-Chávez, G. J., Villa, J. A., Ayala-Zavala, J. F., Heredia, J. B., Sepulveda, D., Yahia, E. M. & González-Aguilar, G. A. (2013). Technologies for extraction and production of bioactive compounds to be used as nutraceuticals and food ingredients: an overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(1):5-23.
- Hilario, M. C., Puga, C. D., Ocana, A. N. & Romo, F. P.-G. (2010). Antioxidant activity, bioactive polyphenols in Mexican goats' milk cheeses on summer grazing. *Journal of Dairy Research*, 77(1):20-26.
- Holmquist, B., Bünning, P. & Riordan, J. F. (1979). A continuous spectrophotometric assay for angiotensin converting enzyme. *Analytical Biochemistry*, 95(2):540-548.
- Jabeen, Q. & Aslam, N. (2013). Hypotensive, angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory and diuretic activities of the aqueous-methanol extract of *Ipomoea reniformis*. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 12(4):769-776.
- Kedare, S. B. & Singh, R. P. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*, 48(4):412-422.
- Ladikos, D. & Lougovois, V. (1990). Lipid oxidation in muscle foods: A review. *Food chemistry*, 35(4):295-314.
- Lehninger, N. D. L. (2006). Principios de bioquímica. São Paulo.
- Li, Z., Jiang, A., Yue, T., Wang, J., Wang, Y. & Su, J. (2013). Purification and identification of five novel antioxidant peptides from goat milk casein hydrolysates. *Journal of Dairy Science*, 96(7):4242-4251.
- Lorenzo, J. M., Pateiro, M., Domínguez, R., Barba, F. J., Putnik, P., Kovačević, D. B., . . . Franco, D. (2018). Berries extracts as natural antioxidants in meat products: A review. *Food Research International*, 106:1095-1104.

- Lund, M. & Ardö, Y. (2004). Purification and identification of water-soluble phosphopeptides from cheese using Fe (III) affinity chromatography and mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(21):6616-6622.
- Martos, G., Contreras, P., Molina, E. & López-Fandiño, R. (2010). Egg white ovalbumin digestion mimicking physiological conditions. *Journal of Agricultural and food chemistry*, 58(9):5640-5648.
- Meira, S. M. M., Daroit, D. J., Helfer, V. E., Corrêa, A. P. F., Segalin, J., Carro, S. & Brandelli, A. (2012). Bioactive peptides in water-soluble extracts of ovine cheeses from Southern Brazil and Uruguay. *Food Research International*, 48(1):322-329.
- Meisel, H., Goepfert, A. S. & Günther, S. A. (1997). ACE-inhibitory activities in milk products. *Milchwissenschaft*, 52307-3011.
- Meyer, J., Bütikofer, U., Walther, B., Wechsler, D. & Sieber, R. (2009). Hot topic: Changes in angiotensin-converting enzyme inhibition and concentrations of the tripeptides Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro during ripening of different Swiss cheese varieties. *Journal of Dairy Science*, 92(3):826-836.
- Pritchard, S. R., Phillips, M. & Kailasapathy, K. (2010). Identification of bioactive peptides in commercial Cheddar cheese. *Food Research International*, 43(5):1545-1548.
- Raikos, V. & Dassios, T. (2014). Health-promoting properties of bioactive peptides derived from milk proteins in infant food: a review. *Dairy Science & Technology*, 94(2):91-101.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9):1231-1237.
- Rizzello, C. G., Losito, I., Gobbetti, M., Carbonara, T., De Bari, M. D. & Zambonin, P. G. (2005). Antibacterial activities of peptides from the water-soluble extracts of Italian cheese varieties. *Journal of Dairy Science*, 88(7):2348-2360.
- Ruiz, J. Á. G., Ramos, M. & Recio, I. (2004). Angiotensin converting enzyme-inhibitory activity of peptides isolated from Manchego cheese. Stability under simulated gastrointestinal digestion. *International dairy journal*, 14(12):1075-1080.
- Ryan, J. T., Ross, R. P., Bolton, D., Fitzgerald, G. F. & Stanton, C. (2011). Bioactive peptides from muscle sources: meat and fish. *Nutrients*, 3(9):765-791.
- Sánchez-Vioque, R., Polissiou, M., Astraka, K., Mozos-Pascual, M. d. l., Tarantilis, P., Herraiz-Peñalver, D. & Santana-Méridas, O. (2013). Polyphenol composition and antioxidant and metal chelating activities of the solid residues from the essential oil industry. *Industrial Crops and Products*, 49(0):150-159.
- Shaiban, M., Al-Mamary, M. & Al-Habori, M. (2006). Total antioxidant activity and total phenolic contents in Yemeni smoked cheese. *Malaysian Journal of Nutrition*, 12(1):87-92.
- Shori, A. B. & Baba, A. S. (2015). Fermented milk derives bioactive peptides with antihypertensive effects. *Integrative Food Nutrition and Metabolism*, 2(3):178-181.
- Silva, R. A., Lima, M. S. F., Viana, J. B. M., Bezerra, V. S., Pimentel, M. C. B., Porto, A. L. F., . . . Lima Filho, J. L. (2012). Can artisanal “Coalho” cheese from Northeastern Brazil be used as a functional food? *Food Chemistry*, 135(3):1533-1538.
- Tonouchi, H., Suzuki, M., Uchida, M. & Oda, M. (2008). Antihypertensive effect of an angiotensin converting enzyme inhibitory peptide from enzyme modified cheese. *Journal of Dairy Research*, 75(3):284-290.
- Torres-Fuentes, C., Alaiz, M. & Vioque, J. (2012). Iron-chelating activity of chickpea protein hydrolysate peptides. *Food Chemistry*, 134(3):1585-1588.

**Recebido:** 15 de fevereiro, 2019.

**Aprovado:** 6. de março, 2019.

**Publicado:** 23 de março, 2019.

**Licenciamento:** Este artigo é publicado na modalidade Acesso Aberto sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 (CC-BY 4.0), a qual permite uso irrestrito, distribuição, reprodução em qualquer meio, desde que o autor e a fonte sejam devidamente creditados.