

Digestão Gastrointestinal *in vitro* de hidrolisados proteicos preparados a partir de subprodutos de Pescada

Ana Cristina Lourenço dos Reis

Relatório apresentado ao Instituto Politécnico de Castelo Branco para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Licenciatura em Engenharia Biológica e Alimentar, realizado sob a orientação científica do Engenheiro Paulo Pires Águas, Professor Adjunto do Departamento de Desenvolvimento Sustentável e Ordenamento do Território do Instituto Politécnico de Castelo Branco.

Agradecimentos

Este relatório não representa apenas o culminar de extensas horas de trabalho dedicado, conhecimentos aprofundados, empenho e esforço impregnados nas suas mais diversas vertentes práticas e teóricas que o compõem. Retrata sim um ânimo conseguido pelo apoio concertado de algumas pessoas sem as quais este objectivo não poderia ter sido alcançado.

Começo por agradecer à minha família, em especial aos meus pais e à minha irmã, que me incutiram valores preciosos para sempre persistir na minha realização profissional, amparando-me nos momentos mais conturbados deste ciclo de estudos que sem a sua paciência, tolerância e incentivo não teria sido possível finalizar.

Ao Fábio, por todo o companheirismo, paciência e dedicação.

Agradeço ao professor Paulo Pires Águas, que com a sua panóplia de conhecimentos e sabedoria habilmente me orientou, tendo despendido a sua inteira disponibilidade para superação de obstáculos que neste relatório pude enfrentar com o seu auxílio.

Estou igualmente grato ao IPIMAR de Lisboa, que me admitiu como estagiário e sem a qual a concretização e aplicação de conhecimentos provenientes de anos de estudo, não tinha sido lograda.

À unidade U-VPPA por toda a sua disponibilidade, à Doutora Narcisa Bandarra, ao Engenheiro Irineu Batista, por todo o apoio durante a realização e interpretação das técnicas laboratoriais, e aos meus colegas de laboratório em especial ao Carlos.

Agradeço especialmente à Engenheira Carla Pires, que foi incansável, a ela devo todo o meu trabalho e empenho nesta instituição, um grande obrigado por todos os ensinamentos metodológico e laboratoriais.

Agradeço à Andreia Sanches, Ana Antunes, Luciana Santos e à Raquel Salvador pela amizade e confiada criada enquanto estudante, obrigado por todos os momentos felizes, por que passamos juntas durante a vida académica.

A todos um GRANDE OBRIGADO.

Digestão Gastrointestinal *in vitro* de hidrolisados proteicos preparados a partir de subprodutos de Pescada

Ana Cristina Lourenço dos Reis

Palavras-chave

Subprodutos de pescada, hidrolisados proteicos, hidrólise enzimática, actividade antioxidante e digestão gastrointestinal *in vitro*.

Resumo

Os hidrolisados proteicos de pescada são produtos obtidos de peixe inteiro ou subprodutos e resultam da ruptura de ligações peptídicas, com a adição de uma molécula de água, por via química ou enzimática. As proteínas do pescado são fragmentadas, em maior ou menor extensão, em aminoácidos e péptidos de diferentes tamanhos. Em termos das suas propriedades nutricionais, são considerados melhores os que são obtidos a partir das proteínas do leite, carne e vegetais. Apresentam também um conjunto de propriedades biológicas que têm sido testadas em ensaios a nível laboratorial, tal como a actividade antioxidante.

Os hidrolisados proteicos de pescado têm revelado poder antioxidante e apresentam efeito sinérgico na presença de outros antioxidantes. Esta actividade depende da natureza da matéria-prima utilizada e do grau de hidrólise dos produtos.

Este trabalho teve como objectivo, a preparação de dois hidrolisados proteicos preparados a partir de restos de pescada por via enzimática. Um dos hidrolisados foi preparado directamente a partir dos restos de pescada, o outro hidrolisado preparado a partir das proteínas de restos de pescada solubilizadas a pH 11,0. A enzima utilizada na hidrólise foi a Alcalase.

Foi determinada a actividade antioxidante de cada um, incluindo a de um hidrolisado proteico comercial preparado a partir do bacalhau, utilizado como referência, através de quatro técnicas específicas DPPH, Poder Redutor, ABTS \cdot^+ e a actividade quelante.

Foi também objectivo deste trabalho a simulação da digestão gastrointestinal *in vitro* em condições controladas dos hidrolisados em estudo, onde foi possível avaliar a actividade antioxidante de cada hidrolisado proteico após a digestão.

Gastrointestinal Digestion of in vitro protein hydrolysates prepared from byproducts of Hake

Ana Cristina Lourenço dos Reis

Keywords

Hake by-products of fish protein hydrolysates, enzymatic hydrolysis, antioxidant activity and in vitro gastrointestinal digestion.

Abstract

Fish protein hydrolysates are products obtained from whole fish or by-products and result from rupture of peptide bonds, with the addition of a water molecule, by chemical or enzymatic way. The fish proteins are fragmented to a greater or lesser extent in, amino acids and peptides of different sizes. In terms of its nutritional properties, are considered the best of which are derived from milk proteins, meat and vegetables. They also have a set of biological properties that have been tested in the laboratory level, such as antioxidant activity.

Fish protein hydrolysates have shown antioxidant power and a synergistic effect in the presence of other antioxidants. This activity depends on the nature of the raw material used and the degree of hydrolysis products.

The objective of this work was the preparation of two protein hydrolysates from hake by-products by enzymatic hydrolysis. One hydrolysate was prepared directly from the minced raw material and other from solubilised proteins at pH 11.0. Alcalase was enzyme used for the hydrolysis.

The antioxidant activity of hydrolysates was determined according to four specific techniques: DPPH, reducing power, ABTS. ⁺ and chelating activity , a commercial protein hydrolysate prepared from cod was used as reference.

It was also objective of this work the simulation of in vitro gastrointestinal digestion of hydrolysates under controlled conditions and the antioxidant activity after digestion of the hydrolysates was evaluated.

Índice Geral

Agradecimentos	iii
Resumo	iv
Abstract	v
Índice Geral:	vi
Índice de Tabelas:	viii
Índice de Figuras	viii
Lista de Abreviaturas	ix
1- Introdução	1
2- Caracterização do local de estágio	3
3- Objectivo do trabalho	4
4- Hidrolisados proteicos de pescado	5
4.1- Caracterização dos hidrolisados proteicos.....	5
5- Hidrólise Enzimática	5
6- Hidrolisados proteicos	6
6.1- Valor nutricional dos HPP.....	6
6.2- Propriedades funcionais dos hidrolisados proteicos.....	6
6.3- Actividades biológicas dos hidrolisados proteicos de pescado.....	8
6.4- Activiadde antioxidante dos hidrolisados proteicos de pescado.....	9
7- Aplicações dos hidrolisados proteicos	9
7.1- Aplicações para a alimentação animal.....	10
7.2- Aplicações para a alimentação humana	10
7.3- Aplicações para fins não nutricionais	11
8- Material e Métodos	11
8.1- Material	11
8.2- Métodos	12
8.2.1- Preparação dos hidrolisados proteicos.....	12
8.2.2- Preparação dos hidrolisados proteicos a partir de proteínas solubilizadas de restos de pescada (HP.Sol) 12	
8.2.3- Preparação dos hidrolisados proteicos a partir de restos de pescada (HP.Restos).....	13
8.3- Determinação do Grau Hidrólise.....	13
8.4- Determinação da Actividade Antioxidante dos hidrolisados proteicos.....	14
8.4.1- Determinação do DPPH - capacidade de eliminação radicalar dos hidrolisados proteicos.....	14
8.4.2- Determinação do poder redutor	15
8.4.3- Determinação do ABTS - Capacidade de eliminação de radicais livres do ABTS	16
8.4.4- Determinação da percentagem de proteína nos hidrolisados proteicos	17

8.4.5- Determinação da actividade quelante	17
8.5- Digestão gastroentestinal <i>in vitro</i> de hidrolisados proteicos	17
8.6- Determinação da actividade antioxidante dos hidrolisados proteicos digeridos	19
9- Discussão dos Resultados	19
9.1- Determinação da percentagem de proteína e rendimento dos HPP	19
9.2- Determinação do Grau Hidrólise (GH)	20
9.3- Determinação da actividade antioxidante dos hidrolisados proteicos	20
9.3.1- Capacidade de eliminação radicalar dos hidrolisados proteicos - DPPH	20
9.3.2- Capacidade de eliminação radicalar dos hidrolisados proteicos digeridos - DPPH.....	21
9.3.3- Poder redutor dos hidrolisados proteicos	22
9.3.4- Poder redutor dos hidrolisados proteicos digeridos	23
9.3.5- ABTS - Capacidade de eliminação de radicais livres do ABTS.....	24
9.3.6- Capacidade de eliminação de radicais livres nos hidrolisados digeridos	25
9.3.7- Actividade Quelante dos hidrolisados proteicos	26
9.3.8- Actividade quelante dos hidrolisados proteicos digeridos.....	27
10- Conclusão.....	28
Referências Bibliográficas	29
ANEXOS.....	32
Anexo I - Metodologia descrita por Schimada et al., (1992) e Picot et al., (2010) para a determinação do DPPH ..	33
Anexo II - Metodologia descrita por Oyaizu et al., (1988) para a determinação do poder redutor.....	34
Anexo III - Metodologia usada para a determinação da actividade quelante, descrita por Decker e Welch, 1990...	35
Anexo IV - Preparação de soluções	36
Anexo V - Determinação do Grau Hidrólise	37
Anexo VI: Determinação da actividade antioxidante dos hidrolisados proteicos	38
Anexo VII: Determinação da actividade antioxidante dos hidrolisados proteicos digeridos	48
Anexo VIII: Curva padrão Trolox.....	65

Índice de Tabelas:

Tabela 1: Percentagem de proteína e rendimento dos hidrolisados proteicos preparados (HP. Restos e HP. Sol).....	19
--	----

Índice de Figuras:

Figura 1: IPIMAR, Instituto de Investigação das Pescas e do Mar de Lisboa	3
Figura 2: Representação esquemática da hidrólise de proteínas	5
Figura 3: Subprodutos de pescada do Cabo provenientes da Indústria GELPEIXE, Loures	11
Figura 4: Subprodutos de pescada, utilizados para a preparação dos hidrolisados HP. Restos e HP. Sol.....	12
Figura 5: Hidrólise Enzimática.....	13
Figura 6: Representação esquemática da simulação gastrointestinal <i>in vitro</i> de acordo com Zhu et al., (2008).....	18
Figura 7: Percentagem do Grau Hidrólise, de cada hidrolisado proteico	20
Figura 8: Capacidade de eliminação de radicais livres de DPPH, dos hidrolisados proteicos preparados a partir de restos de pescada e do hidrolisado comercial de bacalhau	20
Figura 9: Capacidade de eliminação de radicais livres de DPPH, nos hidrolisados HP.Sol, HP. Restos e HP.Cod depois da digestão gastrointestinal	21
Figura 10: Poder redutor dos diferentes hidrolisados proteicos.....	22
Figura 11: Representação gráfica do poder redutor dos hidrolisados proteicos depois da digestão gastrointestinal	23
Figura 12: Capacidade de eliminação de radicais livres do ABTS ⁺ dos diferentes hidrolisados proteicos	24
Figura 13: Representação gráfica dos resultados da determinação da actividade antioxidante Trolox, dos hidrolisados nos diferentes tempos da digestão.....	25
Figura 14: Representação gráfica da actividade quelante de cada hidrolisado proteico	26
Figura 15: Representação gráfica da percentagem de actividade quelante de cada hidrolisado proteico nos diferentes tempos de digestão gastrointestinal.....	27

Lista de abreviaturas

- %- Percentagem ou por cento
- μl - Microlitro, unidade de medida
- Abs- Absorvância
- ABTS- 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt
- ABTS.⁺-Radical ABTS
- Act.- Abreviatura para a designação de Actividade
- Conct- Abreviatura para a designação, concentração
- COOH- Grupo carboxilo
- DPPH- 2,2-difenil-1-picrilhidraila
- Fe^{2+} - Óxido de ferro
- Fe^{3+} - Óxido ferrico
- Fig- Abreviatura para a designação, Figura
- g- grama, unidade de medida
- GH- Grau de hidrólise
- h- Número de ligações OH hidrolisadas
- HCl- Ácido clorídrico
- HP- Hidrolisado proteico
- HP.Cod- Hidrolisado proteico comercial de bacalhau
- HP.Restos- Hidrolisado proteico preparado a partir de restos de pescada
- HP.Sol- Hidrolisado proteico preparado a partir de proteína solubilizada de restos de pescada
- HPP- Hidrolisados proteicos de peixe
- htot- Número total de ligações péptidicas
- IPIMAR- Instituto de Investigação das Pescas e do Mar
- M- Molaridade
- mg- Miligramas, unidade de medida
- ml- Mililitros, unidade de medida
- NaHCO_3 - Bicarbonato de Sódio
- NaOH- Hidróxido de Sódio
- NH_2 - Grupo amino
- nm- Nanómetro, unidade de medida
- nM- Unidade medida Trolox
- °C- Graus Célcio
- OH- Hidróxido
- OPA- Ortoftalaldeído
- P(%)-Percentagem de proteína
- pH- Potencial Hidrogeniónico
- PR- Poder redutor
- rpm- Rotações por minuto
- TCA- Ácido Tricloacético
- TEAC-Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox
- terminal C- Terminal carboxilo
- terminal N- Terminal amino
- U-VPPA- Unidade de Valorização dos Produtos da Pesca e Aquicultura
- x g-Força centrífuga relativa à aceleração da gravidade