

## PEPTÍDEOS BIOATIVOS DE PLASMA SUÍNO: CARACTERIZAÇÃO E POTENCIAL DE INIBIÇÃO DAS ENZIMAS DIGESTIVAS $\alpha$ -AMILASE E $\alpha$ -GLUCOSIDASE<sup>1</sup>

Nathana Zamboni Barilli<sup>2</sup>, Anieli Pinto Kempka<sup>3</sup>, Cristine Vogel<sup>4</sup>, Eduarda Baggio Paglia<sup>5</sup>.

<sup>1</sup> Vinculado ao projeto “Hidrólise mecânica e enzimática de proteínas para obtenção de peptídeos bioativos”

<sup>2</sup> Acadêmico (a) do Curso de Engenharia Química – CEO – Bolsista PROBIC

<sup>3</sup> Orientador, Departamento de Engenharia de Alimentos e Engenharia Química – CEO – [aniela.kempka@udesc.br](mailto:aniela.kempka@udesc.br)

<sup>4</sup> Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos – CEO

<sup>5</sup> Acadêmico (a) do Curso de Engenharia Química – CEO.

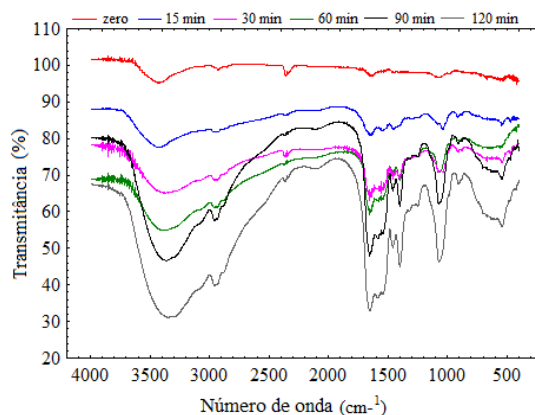
O uso de subprodutos agroindustriais associado ao uso de enzimas, tem se mostrado muito promissor para a obtenção de compostos bioativos, através de reações de hidrólise, realizadas por proteases, que são enzimas que clivam ligações peptídicas em proteínas, peptídeos e aminoácidos. Os peptídeos compostos por fragmentos de proteínas de 2 a 20 sequências de aminoácidos, são conhecidos como peptídeos bioativos. O sangue suíno obtido em matadouros, que representa de 3 a 5% do peso vivo de um animal, é caracterizado como um subproduto reutilizável, sendo dividido em duas frações principais: hemoglobina e proteína plasmática. O sangue suíno coletado sanitariamente pode ser processado para a obtenção de diferentes hemoderivados, que podem ser usados em produtos alimentícios para melhorar as propriedades tecnológicas e modificados para fornecer propriedades bioativas promotoras da saúde. A atividade antidiabética de um composto, quando determinada *in vitro*, é caracterizada pela inibição de uma série de enzimas, dentre elas estão a  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glucosidase. Os medicamentos utilizados por pacientes com *Diabetes mellitus* tipo 2 (DM2), caracterizado como um distúrbio metabólico, são responsáveis pela inibição reversível nestas enzimas, retardando a absorção de carboidratos e suprimindo a hiperglicemia pós-prandial. O objetivo deste trabalho foi caracterizar hidrolisados de plasma suíno, obtidos com uso de uma protease alcalina derivada de *Bacillus licheniformis* e determinar o seu potencial de inibição das enzimas  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glucosidase. As condições de hidrólise do plasma foram otimizadas em 65°C, pH 8,5, 125 rpm, relação enzima/substrato de 5% (m/m), para os tempos de 15 min, 30 min, 60 min, 90 min e 120 min de reação. O tamanho molecular dos hidrolisados foi determinado por meio da eletroforese SDS-PAGE e as ligações químicas por meio da Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), com a dispersão da amostra em comprimidos de KBr e leitura dos espectros (4000 - 400  $\text{cm}^{-1}$ ) e resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ , varrendo 64 vezes para determinar as transmitâncias. A inibição da  $\alpha$ -amilase da saliva humana (tipo IX-A, 1.000-3.000  $\text{U mg}^{-1}$ , Sigma-Aldrich) pelos hidrolisados, diluídos para 0,1; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0  $\text{mg/mL}$  (em relação a proteína solúvel), foi quantificada de acordo com Bernfeld (1951) e Oboh et al. (2011), utilizando amido de milho como substrato. A inibição da  $\alpha$ -glucosidase de *Saccharomyces cerevisiae* (Tipo I,  $\geq 10 \text{ U mg}^{-1}$ , Sigma-Aldrich), pelos mesmos hidrolisados, foi quantificada de acordo com o método descrito por Apostolidis et al. (2007), utilizando pNPG (5 mM) como substrato. O hidrolisado apresentou grau de hidrólise máximo de 45,28%. Por meio da SDS-PAGE, verificou-se que os peptídeos apresentaram tamanhos moleculares abaixo de 15 kDa, o que pode caracterizar peptídeos bioativos. O FTIR (Figura 1) mostrou intensificação das bandas de 900 e 1000  $\text{cm}^{-1}$ ,

entre 1400 e 1500  $\text{cm}^{-1}$ , e entre 3200 e 3400  $\text{cm}^{-1}$ . A protease alcalina catalisa a hidrólise de ligações peptídicas, resultando na formação de terminais C ( $\text{COO}^-$ ) e terminais N ( $\text{NH}_3^+$ ), alterando a estrutura primária e secundária da proteína. As bandas mais importantes que registram essas mudanças incluem a deformação  $\text{NH}_3^+$  (1516  $\text{cm}^{-1}$ ), o alongamento  $\text{COO}^-$  (1400  $\text{cm}^{-1}$ ), a amida I ( $\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$ ) e a amida II ( $\sim 1550 \text{ cm}^{-1}$ ), que foram visivelmente alterados nas amostras de hidrolisado, demonstrando que houve a hidrólise da proteína plasmática. Os hidrolisados inibiram a  $\alpha$ -amilase e não inibiram a  $\alpha$ -glucosidase (Tabela 1). Os resultados evidenciam que para todas as concentrações testadas, exceto para a concentração a 1,0  $\text{mg mL}^{-1}$ , não se obteve diferença estatística no percentual de inibição de  $\alpha$ -amilase para os hidrolisados obtidos nos diferentes tempos. Para as concentrações acima de 1  $\text{mg mL}^{-1}$ , a porcentagem de inibição da  $\alpha$ -amilase aumentou. Para os ensaios de inibição da  $\alpha$ -glucosidase, os resultados revelaram pouca ou nenhuma atividade inibitória dos hidrolisados, para as concentrações abaixo de 1  $\text{mg mL}^{-1}$ .

**Tabela 1.** Inibições (%) da  $\alpha$ -amilase e da  $\alpha$ -glucosidase pelos hidrolisados de plasma suíno em diferentes concentrações.

Proteína solúvel ( $\text{mg mL}^{-1}$ )	$\alpha$ -amilase				
	H <sub>15</sub>	H <sub>30</sub>	H <sub>60</sub>	H <sub>90</sub>	H <sub>120</sub>
2	1,88 $\pm$ 0,27 <sup>aA</sup>	2,09 $\pm$ 0,33 <sup>aA</sup>	2,08 $\pm$ 0,41 <sup>aA</sup>	2,16 $\pm$ 0,45 <sup>aA</sup>	2,21 $\pm$ 0,25 <sup>aA</sup>
1,5	1,32 $\pm$ 0,21 <sup>abA</sup>	1,50 $\pm$ 0,36 <sup>abA</sup>	1,55 $\pm$ 0,21 <sup>abA</sup>	1,71 $\pm$ 0,35 <sup>abA</sup>	1,78 $\pm$ 0,36 <sup>abA</sup>
1	1,04 $\pm$ 0,13 <sup>abB</sup>	0,84 $\pm$ 0,13 <sup>bcB</sup>	1,17 $\pm$ 0,13 <sup>bcB</sup>	1,19 $\pm$ 0,12 <sup>bcA</sup>	1,29 $\pm$ 0,12 <sup>ba</sup>
0,5	0,32 $\pm$ 0,28 <sup>cA</sup>	0,39 $\pm$ 0,27 <sup>cA</sup>	0,34 $\pm$ 0,29 <sup>cA</sup>	0,46 $\pm$ 0,24 <sup>cdA</sup>	0,61 $\pm$ 0,14 <sup>cA</sup>
0,1	0,24 $\pm$ 0,24 <sup>cA</sup>	0,39 $\pm$ 0,36 <sup>cA</sup>	0,25 $\pm$ 0,25 <sup>cA</sup>	0,15 $\pm$ 0,13 <sup>dA</sup>	0,15 $\pm$ 0,13 <sup>cA</sup>
	$\alpha$ -glucosidase				
	H <sub>15</sub>	H <sub>30</sub>	H <sub>60</sub>	H <sub>90</sub>	H <sub>120</sub>
2	1,28 $\pm$ 0,51 <sup>aA</sup>	1,36 $\pm$ 0,56 <sup>abA</sup>	1,58 $\pm$ 0,48 <sup>aA</sup>	1,58 $\pm$ 0,50 <sup>aA</sup>	1,62 $\pm$ 0,52 <sup>aA</sup>
1,5	1,19 $\pm$ 0,03 <sup>aA</sup>	1,41 $\pm$ 0,52 <sup>aA</sup>	1,23 $\pm$ 0,02 <sup>aA</sup>	1,40 $\pm$ 0,47 <sup>aA</sup>	1,15 $\pm$ 0,03 <sup>aA</sup>
1	0,94 $\pm$ 0,82 <sup>abA</sup>	1,00 $\pm$ 0,86 <sup>abA</sup>	0,95 $\pm$ 0,82 <sup>abA</sup>	1,01 $\pm$ 0,87 <sup>abA</sup>	0,00 $\pm$ 0,01 <sup>ba</sup>
0,5	0,00 $\pm$ 0,01 <sup>bB</sup>	0,00 $\pm$ 0,01 <sup>bB</sup>	0,00 $\pm$ 0,01 <sup>bB</sup>	0,00 $\pm$ 0,01 <sup>bB</sup>	1,01 $\pm$ 0,76 <sup>abA</sup>
0,1	0,00 $\pm$ 0,01 <sup>ba</sup>	0,00 $\pm$ 0,01 <sup>ba</sup>	0,00 $\pm$ 0,01 <sup>ba</sup>	0,00 $\pm$ 0,01 <sup>ba</sup>	0,00 $\pm$ 0,01 <sup>ba</sup>

Médias seguidas de diferentes letras minúsculas, na mesma coluna, diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Tukey com 95% de confiabilidade. Médias seguidas de diferentes letras maiúsculas, na mesma linha, diferem estatisticamente pelo Tukey. H<sub>15</sub>= hidrolisado de 15 min; H<sub>30</sub>= hidrolisado de 30 min; H<sub>60</sub>= hidrolisado de 60 min; H<sub>90</sub>= hidrolisado de 90 min; H<sub>120</sub>= hidrolisado de 120 min.



**Figura 1.** Espectros de infravermelho dos hidrolisados de plasma suíno.

**Palavras-chave:** Hidrólise. Protease alcalina. Peptídeos.