



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**SORO DE LEITE BUBALINO HIDROLISADO COM ALCALASE COMO AGENTE DE
CONTROLE DO ESCURECIMENTO DE MAÇÃS MINIMAMENTE PROCESSADAS**

José Dilson Francisco da Silva

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**SORO DE LEITE BUBALINO HIDROLISADO COM ALCALASE COMO AGENTE DE
CONTROLE DO ESCURECIMENTO DE MAÇÃS MINIMAMENTE PROCESSADAS**

José Dilson Francisco da Silva

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos como um dos requisitos à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Adriano Brandelli

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

2017

CIP - Catalogação na Publicação

da Silva, José Dilson Francisco

Soro de leite bubalino hidrolisado com Alcalase como agente de controle do escurecimento de maçãs minimamente processadas / José Dilson Francisco da Silva. -- 2017.

69 f.

Orientador: Adriano Brandelli.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Processamento de alimentos. 2. Aditivos alimentares. 3. Peptídeos bioativos. 4. Proteases. 5. Aproveitamento de subprodutos industriais. I. Brandelli, Adriano, orient. II. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Autor: José Dilson Francisco da Silva

(Químico de Alimentos – Universidade Federal de Pelotas).

Título da dissertação: Soro de leite bubalino hidrolisado com Alcalase como agente de controle do escurecimento de maçãs minimamente processadas.

Submetida como parte dos requisitos para a obtenção do grau de
MESTRE EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS.

Aprovada em/...../.....

Pela banca examinadora:

Homologada em/...../.....

Por:

Prof. Dr. Adriano Brandelli
Orientador
ICTA/UFRGS

Prof. Dr. Adriano Brandelli
Coordenador do PPGCTA/UFRGS

Prof^a. Dr^a. Ana Carolina Ritter
Banca
ICTA/UFRGS

Prof. Dr. Vitor Manfroi
Diretor do ICTA/UFRGS

Prof. Dr. Plinho Francisco Hertz
Banca
ICTA/UFRGS

Prof^a. Dr^a. Carolina Pereira Kechinski
Banca
UFCSPA

AGRADECIMENTOS

Aos Professores e amigos Adriano Brandelli e Ana Paula Folmer Correa, pelos ensinamentos, paciência, motivação e auxílio nos momentos mais inesperados, aos colegas do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFRGS, especialmente aos membros do Laboratório 218, pelos momentos de aprendizagem, trocas de experiências e prestatividade, à Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), pelo incentivo, e à minha família, pelo amor e apoio.

SORO DE LEITE BUBALINO HIDROLISADO COM ALCALASE COMO AGENTE DE CONTROLE DO ESCURECIMENTO DE MAÇÃS MINIMAMENTE PROCESSADAS¹

José Dilson Francisco da Silva

Orientador: Adriano Brandelli

RESUMO

Enzimas proteolíticas são comumente empregadas na liberação de peptídeos bioativos com potencial aplicabilidade como aditivos em alimentos. Neste trabalho, estudou-se a capacidade de inibição do escurecimento de maçãs minimamente processadas do soro de leite de búfala hidrolisado por Alcalase em diferentes intervalos, t_i ($i = 0$ h, 0,5 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h ou 6 h). O processo de hidrólise foi acompanhado por determinação do grau de hidrólise (GH). Para se entender possíveis modos de ação sobre o escurecimento enzimático, o soro, ao longo do tempo de hidrólise, foi submetido às análises de capacidade antioxidante (capacidade de sequestro do radical ABTS^{•+}, atividade quelante de Fe²⁺ e poder redutor), reatividade com quinonas e atividade inibitória sobre polifenoloxidasas (PFO) extraídas de maçãs *Red Delicious*. Após os ensaios *in vitro*, o hidrolisado t_{4h} foi testado quanto à capacidade de inibição do escurecimento de maçãs *Red Delicious* minimamente processadas, determinada por meio de análises de luminosidade (parâmetro L*) e índice de escurecimento (IE). O soro apresentou aumento significativo ($p < 0,05$) do GH, da atividade antioxidante, da reatividade com quinonas e da atividade inibitória de PFO em função do tempo de hidrólise. Especificamente para a atividade inibitória de PFO, o hidrolisado t_{4h} alcançou pico de inibição próximo de 50 %. Quanto à capacidade de inibição do escurecimento das maçãs minimamente processadas, o hidrolisado manteve o parâmetro L* das maçãs durante 6 dias de armazenamento, não diferindo significativamente ($p > 0,05$) do metabissulfito. Além da luminosidade, o soro de leite hidrolisado conseguiu manter melhor o IE das maçãs durante esse tempo de armazenamento, comparativamente ao soro não hidrolisado ($p < 0,05$). Esses resultados evidenciam informações sobre possíveis aplicações de soro de leite bubalino hidrolisado com Alcalase como substituto

natural de aditivos convencionalmente utilizados no controle desse tipo de escurecimento em alimentos.

Palavras-chave: peptídeos bioativos, atividade inibitória sobre PFO, estabilização de quinonas, aditivo alimentício natural, estabilidade da cor.

¹Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos (linha de pesquisa em Qualidade de Alimentos, especialidade em Química e Bioquímica de Alimentos), Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, março de 2017.

BUFFALO CHEESE WHEY HYDROLYZED WITH ALCALASE AS A ANTIBROWNING AGENT IN MINIMALLY PROCESSED APPLE¹

José Dilson Francisco da Silva

Adviser: Adriano Brandelli

ABSTRACT

Proteolytic enzymes are commonly employed in the release of bioactive peptides with potential applicability in food additives. In this work, the ability to inhibit the browning of minimally processed apples from Alcalase hydrolysed buffalo whey at different time, t_i ($i = 0$ h, 0.5 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h or 6 h). The hydrolysis process was followed by determination of the degree of hydrolysis (DH). In order to understand possible modes of action on the enzymatic browning, the whey was submitted to the analysis of the antioxidant capacity (capacity of sequestration of the ABTS^{•+} radical, Fe²⁺ chelating activity and reducing power), reactivity with quinones and inhibitory activity on polyphenoloxidases (PPO) extracted from *Red Delicious* apples. Following the in vitro assays, the t_{4h} hydrolyzate was tested for the ability to inhibit the browning of minimally processed *Red Delicious* apples, determined by means of analysis of luminosity (parameter L*) and browning index (BI). Buffalo whey shows significant increase ($p < 0.05$) in DH, antioxidant activity, reactivity with quinones and PPO inhibitory activity as a function of the hydrolysis time. Specifically for the PPO inhibitory activity, the t_{4h} hydrolyzate reached a near 50% inhibition peak. As for the ability to inhibit the browning of the minimally processed apples, the hydrolyzate kept the L* parameter of the apples during 6 days of storage, not statistically differing ($p > 0.05$) from the metabisulfite. In addition to the luminosity, the hydrolyzed whey was able to maintain the IE of the apples better during this storage time, compared to the unhydrolyzed whey ($p < 0.05$). These results evidenced information on possible applications of hydrolysed buffalo whey with Alcalase as a natural substitute for additives conventionally used in the control of this type of browning in foods.

Key words: bioactive peptides, PFO inhibitory activity, quinone stabilization, natural food additive, color stability.

¹Master of Science dissertation in Food Science and Technology (research line in Food Quality, specialty in Food Chemistry and Biochemistry), Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, March, 2017.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE FIGURAS	11
1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 Estrutura e função biológica das PFO.....	16
2.2 Importância industrial das PFO	19
2.3 Controle de PFO e do escurecimento enzimático em alimentos.....	21
2.4 Peptídeos bioativos: atividade antioxidante e capacidade de inibição de PFO.	27
2.5 Produção e pesquisa de peptídeos com capacidade de inibição de PFO.....	29
2.6 Soro de leite de búfala como substrato para a produção de peptídeos bioativos.	30
2.7 Situação mundial da produção de leite e soro de leite de búfalo.....	33
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
3.1 Artigo.....	37
4 CONCLUSÕES	57
5 PERSPECTIVAS	58
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
ANEXO – Comprovante de submissão, para publicação, do artigo intitulado “Buffalo cheese whey hydrolyzed with alcalase as an antibrowning agent in minimally processed apple” junto ao corpo editorial do Journal of Food Science and Technology...	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição comparativa do soro de leite bovino e bubalino, resultante da fabricação de queijo Mozzarella. ¹ Adaptada de (1)Yazici e Akbulut (2007); (2) Nawaz; Masud e Sammi (2011); (3) Rathi et al. (2015); (4) Teixeira e Fonseca (2008); (5) Rektor e Vatai (2004); Maciel e Waszczynskyj (1998).....	31
Tabela 2 - Composição comparada do perfil de aminoácidos (%) da β -Lactoglobulina do soro de leite bovino (<i>Bos Taurus</i>), bubalino (<i>Bubalus bubalis</i>), caprino (<i>Capra hircus</i>) e ovino (<i>Ovis aries</i>). Fonte: Adaptado de Dixit, KK e Singh (2012).....	33

Artigo referente ao item 3.1

Table 1. Evolution of the L* parameter of the minimally processed apples treated with different inhibitors of enzymatic browning and stored for 6 days. Values given as mean \pm standard deviation. Values followed by the same letter, uppercase (comparison of inhibitors) and lowercase (comparison of storage time) did not differ statistically from each other by the Tukey test ($p > 0.05$), n = 3. t = storage time.....	51
Table 2. Evolution of BI of minimally processed apples treated with different inhibitors of enzymatic browning and stored for 6 days. Values given as mean \pm standard deviation. Values followed by the same letter, uppercase (comparison of inhibitors) and lowercase (comparison of storage time) did not differ statistically from each other by the Tukey test ($p > 0.05$), n = 3. t = storage time.....	52

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Modelos estruturais propostos para PFO de diferentes fontes. (A) Estrutura quaternária de PFO de maçã Fuji (*Malus domestica* Borkh. cv. Red Fuji) (LIU et al., 2015) e (B) de uva Grenache (*Vitis vinífera*), destacando o sítio ativo (seta 1) (VIRADOR et al., 2010). (C) Sítio ativo de PFO isolada de batata-doce (*Ipomoea batatas*), mostrando dois átomos de cobre (esferas azuis), cada um coordenado por três resíduos de histidina (estruturas vermelhas e verdes) (HAMANN et al., 2017) e (D) estruturas sobrepostas de PFO de uva (*Vitis vinífera*) (em azul) de batata doce (*Ipomoea batatas*) (em amarelo) e de *Neurospora crassa* (em verde) mostrando um bolsão (seta 2) que delimita o sítio ativo (VIRADOR et al., 2010)..... 17
- Figura 2 – Mecanismo geral proposto de formação de melaninas catalisada por polifenoloxidase, destacando duas fases principais: uma fase enzimática (etapas de I a IV), em que, após ligação de um monofenol aos dois átomos de cobre (Cu^{II}) do sítio ativo da PFO, oxida-se à o-quinona, e uma fase química (etapa V), em que as o-quinonas se polimerizam espontaneamente, formando eumelaninas. Fonte: Os autores, adaptado de Carletti Nervo e Cattivelli (2014), Gamez et al. (2001), Ging et al. (2002) e Güray (2009)..... 18
- Figura 3 – Esquema de uma célula vegetal destacando algumas organelas: 1 = ribossomos, 2 = plastídeos (onde estão compartimentalizadas as PFO), 3 = retículo endoplasmático, 4 = vacúolo (onde cerca de 97 % dos compostos fenólicos estão armazenados), 5 = parede celular, 6 = complexo de Golgi, 7 = mitocôndrias, 8 = núcleo e 9 = lisossomo. Fonte: os autores, adaptado de Toivonen e Brummell (2008)..... 20
- Figura 4 - Estrutura de uma o-quinonas, mostrando em (a) e (b) os carbonos α e β de cada grupo carbonila α,β -insaturado (sistemas de Michael), e respectivas formas de ressonância. Fonte: adaptado de Vollhardt e Schore (2009)..... 22
- Figura 5 - Equilíbrio iônico em solução aquosa entre dióxido de enxofre (a), metabissulfito (b), bissulfito (c) e sulfito (d) em pH ácido (>2 e \leq 7). Fonte: Adaptado de Maia, Lima e Freitas (2006), Scrimgeour et al. (2015), Türke et al. (2012) e Wedzicha (1984)..... 23

Figura 6 - Mecanismo proposto de estabilização de <i>o</i> -quinonas (a) por bissulfito (b) em alimentos, via reação de adição nucleofílica (etapas entre V'' a IX), dando adutos do tipo 1,4-Michael (c). Dado: PFO = polifenoloxidase. Fonte: adaptado de Ali et al. (2015), Danilewicz (2007), Ging et al. (2002).....	24
Figura 7 - Mecanismo proposto de estabilização de <i>o</i> -quinonas (a) por bissulfito (b) em alimentos, via reação de adição nucleofílica, dando aduto do tipo 1,2-Michael (c). O aduto sofre reações subseqüentes de eliminação (etapas VIII a IX), formando um <i>o</i> -catecol correspondente (d). Dado: PFO = polifenoloxidase. Fonte: adaptado de Danilewicz (2007), Danilewicz (2011), Ging et al. (2002).....	25
Figura 8 – Mecanismo proposto de estabilização de <i>o</i> -quinonas (a) por L-cisteína (b) em alimentos, via reação de adição nucleofílica do tipo Michael 1,4 (etapas de V'' a IX), formando tiotecoís incolores (c,d). Conseqüentemente, a etapa de polimerização das <i>o</i> -quinonas (etapa V') é inibida. Fonte: adaptado de Ali et al. (2015), Ging et al. (2002).....	26
Figura 9 - Alinhamento múltiplo de seqüências de duas variantes da β -Lactoglobulina do leite bovino (variante A e variante B) com a β -Lactoglobulina do leite bubalino. A β -Lactoglobulina bubalina difere, respectivamente, em dois resíduos de aminoácidos e em quatro resíduos de aminoácidos das variantes B e A da β -Lactoglobulina bovina. Fonte: Adaptado de Czerwenka, Müller, Lindner (2010).....	34

Artigo referente ao item 3.1

Figure 1. Characterization of the hydrolysed buffalo whey during the hydrolysis time with Alcalase in terms of the degree of hydrolysis (GH),%, (\blacktriangle) and in relation to the antioxidant activity measured by ABTS•+ radical sequestration,%, (\blacklozenge), iron chelating activity,%, (+) and reducing power, Abs _{700nm} , (\times). Data on the same line accompanied by the same letters do not differ statistically from each other by the Tukey test ($p > 0.05$), $n = 3$. Source: authors.....	46
Figure 2. Quinone reactivity (Abs _{390nm}) (\times) and PPO inhibitory activity,%, (\blacksquare) of <i>Red Delicious</i> apple by the buffalo whey hydrolyzed by Alcalase. Data on the same line accompanied by the same letters do not differ statistically from each other by the Tukey test ($p > 0.05$), $n = 3$. Source: authors.....	47

Figure 3. A possible mechanism for the enzymatic browning of foods (steps I to V'), highlighting two main phases: an enzymatic phase (steps I to IV), in which a monophenol (a), after binding to copper (Cu^{II}) of the active site of PPO, oxidizes to *o*-quinone (b); and a chemical phase (step V'), wherein the *o*-quinones spontaneously polymerize, forming melanins (c). The amino acid L-cysteine (d) acts as inhibitor of this modification (steps V'' to IX), blocking the chemical phase, via nucleophilic addition reaction of Michael 1,4, forming colorless thiotecopes (e, f). Source: The authors, adapted from Ali et al. (2015), Carletti Nervo e Cattivelli (2014), Gamez et al. (2001), Ging et al. (2002) e Güray (2009)..... 49

Figure 4. Enzymatic browning of minimally processed apples treated with different inhibitors and stored for up to 6 days. Control = treatment with phosphate buffer; t_0 = unhydrolyzed whey; t_4 = 4 h hydrolysate..... 50

1 INTRODUÇÃO

A hidrólise enzimática de proteínas é considerada uma estratégia interessante para a produção de peptídeos bioativos, com aplicabilidade nas áreas médica, farmacêutica e de alimentos. Na área de alimentos, esses peptídeos têm demonstrado potencialidades para uso como aditivos, principalmente, devido à sua capacidade antimicrobiana e antioxidante. Nos alimentos, peptídeos bioativos podem inibir diversas rotas de oxidação de ácidos graxos insaturados, vitaminas e compostos fenólicos, em que agem como estabilizadores de radicais livres por doação de prótons, como agentes quelantes de metais de transição, catalisadores dessas reações de oxidação, e como agentes redutores. Esses mecanismos de ação, especialmente atividade quelante e poder redutor tem contribuído para explicar alguns achados sobre a capacidade com que hidrolisados proteicos conseguem inibir o escurecimento enzimático dos alimentos, processo oxidativo em que estão envolvidas principalmente as enzimas polifenoloxidase (PFO). Essas enzimas são responsáveis pela transformação de compostos fenólicos em o-quinonas, que, por sua vez, polimerizam-se, formando melaninas, os pigmentos responsáveis pela percepção visual dessa modificação.

Visto que o escurecimento enzimático pode implicar em perdas econômicas e redução do valor comercial de matérias-primas e de alimentos prontos para consumo, esse defeito é um dos grandes problemas enfrentados pela cadeia de produção agropecuária. Ele atinge, principalmente, frutas, hortaliças, leguminosas, crustáceos e cogumelos comestíveis, processados ou não. O uso de inibidores químicos, como metabissulfitos, ácido cítrico, ácido ascórbico e L-cisteína, é a estratégia comercial mais utilizada para se controlar esse problema. Entretanto, esses agentes apresentam algumas limitações quanto ao uso, podendo-se citar a alta toxicidade do sulfitos e metabissulfitos, o alto custo do ácido ascórbico e da cisteína e a baixa eficiência do ácido cítrico.

Portanto, há um interesse de se estudar novos métodos químicos de inibição desse tipo de escurecimento, alinhados, ao mesmo tempo, à segurança alimentar e uso racional de recursos naturais. Nesse sentido, algumas proteínas isoladas de resíduos industriais foram objetos de pesquisa, entretanto, raros são os estudos que avaliaram a influência da sua hidrólise sobre a essa atividade. Quanto às proteínas do soro de leite, subproduto

resultante da fabricação de queijos e caseínas, pouco se sabe sobre o sua capacidade inibitória contra esse tipo o escurecimento enzimático. Nesse contexto, este trabalho visou estudar a capacidade de inibição do escurecimento enzimático de maçãs minimamente processadas por soro de leite de búfala hidrolisado durante diferentes tempos com Alcalase.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Estrutura e função biológica das PFO

Polifenoloxidasas (PFO) é o nome genérico dado às enzimas capazes de oxidar substâncias fenólicas. Classificadas como oxirredutases, são cuproproteínas amplamente distribuídas em vegetais, animais, fungos e bactérias, abrangendo tirosinase (EC 1.14.18.1) e lacase (EC 1.10.3.2). Enquanto as tirosinases catalisam a hidroxilação de monofenóis a difenóis - atividade de monofenolase ou cresolase - e a oxidação de difenóis em *o*-quinonas - atividade de difenolase ou catecol oxidase - a lacases catalisam a oxidação de *o*-difenois em *o*-quinonas (GARCIA-JIMENEZ et al., 2016; LIU et al., 2015). Apesar de as PFO mostrarem estrutura tridimensional ligeiramente diversa em função da origem, estudos verificaram que elas apresentam em comum estrutura helipsóide (Figura 1A e 1B), com sítio ativo hidrofóbico formado por dois átomos de cobre, cada um coordenado por três resíduos de histidina das hélices (Figura 1B e 1C). Esse sítio se encontra no centro da estrutura helicoidal e seu acesso pelo substrato se dá por uma espécie de “túnel” (Figura 1C e 1D) (HAMANN et al., 2017; LIU et al., 2015; VIRADOR et al., 2010).

Dentre as funções biológicas das PFO, destaca-se sua participação, no processo de produção das melaninas, pigmento com múltiplas funções nos seres vivos. A biossíntese desses pigmentos pode ser dividida em duas fases principais (Figura 2): uma fase enzimática (etapas de I a V), em que PFO, após ligação do composto fenólico aos átomos de cobre (Cu^{II}) do sítio ativo, este se oxida à *o*-quinona, e uma fase química (etapa IV), em que as *o*-quinonas se polimerizam espontaneamente, formando os pigmentos melaninas (CHANG, 2009; GAMEZ et al., 2001; GING et al., 2002; GÜRAY, 2009). Esses pigmentos estão localizados em muitos tecidos animais e em praticamente todos os organismos vivos, como consequência das suas múltiplas funções. A maioria dessas funções está relacionada com a proteção contra agentes externos, sendo a fotoproteção da pele o exemplo clássico (ALMEIDA-PAES et al., 2017; FRONK et al., 2015; SARNA et al., 2017). Acredita-se que, no homem, esses polímeros protegem a retina contra o estresse oxidativo induzido pela luz e dá estabilização mecânica ao epitélio

pigmentar da retina. Também, é possível que contribuam para a acuidade visual devido à sua capacidade de impedir a reflexão da luz no olho (SARNA et al., 2017).

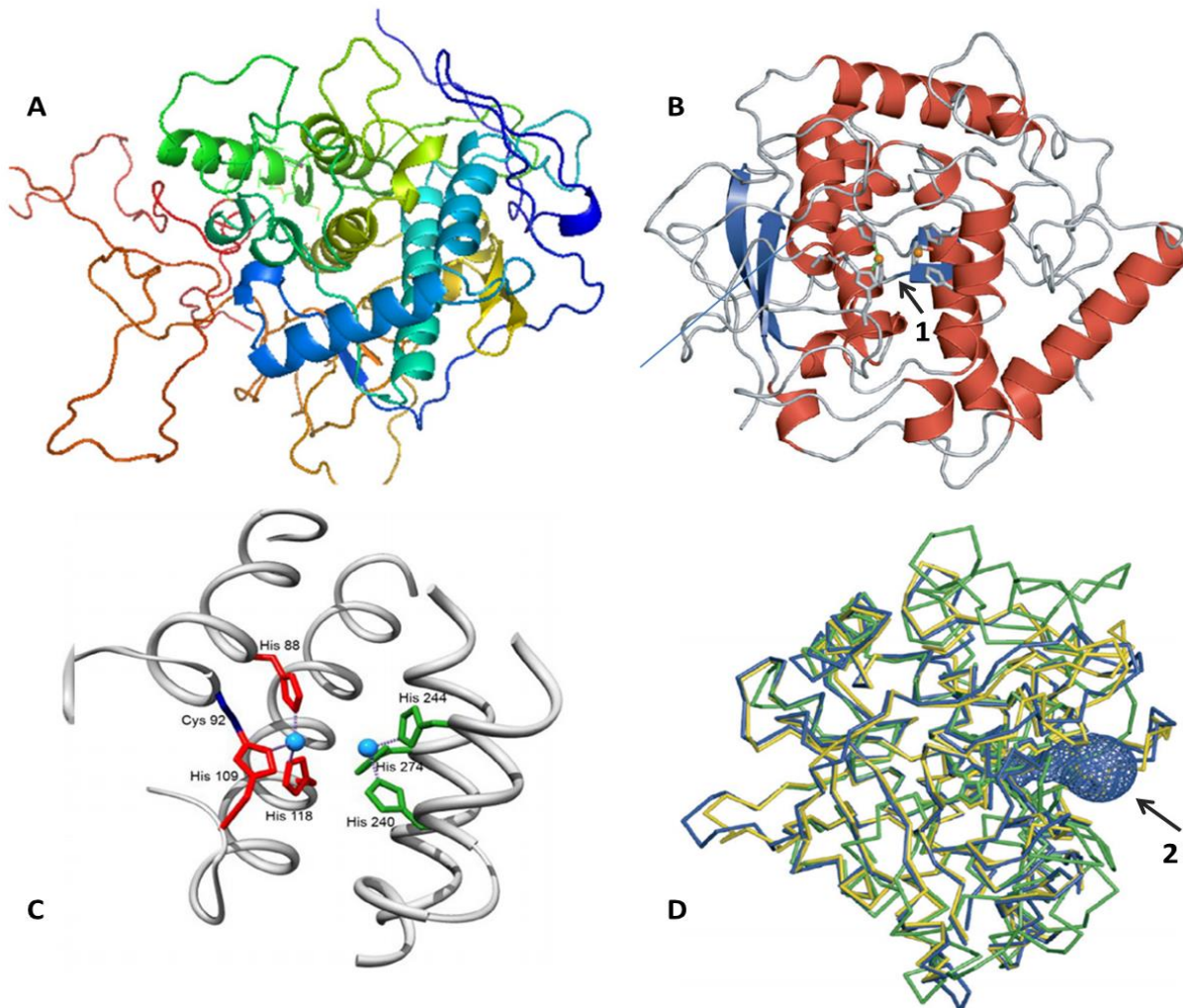


Figura 1 - Modelos estruturais propostos para PFO de diferentes fontes. (A) Estrutura quaternária de PFO de maçã Fuji (*Malus domestica* Borkh. cv. Red Fuji) (LIU et al., 2015) e (B) de uva Grenache (*Vitis vinifera*), destacando o sítio ativo (seta 1) (VIRADOR et al., 2010). (C) Sítio ativo de PFO isolada de batata-doce (*Ipomoea batatas*), mostrando dois átomos de cobre (esferas azuis), cada um coordenado por três resíduos de histidina (estruturas vermelhas e verdes) (HAMANN et al., 2017) e (D) estruturas sobrepostas de PFO de uva (*Vitis vinifera*) (em azul) de batata doce (*Ipomoea batatas*) (em amarelo) e de *Neurospora crassa* (em verde) mostrando um bolsão (seta 2) que delimita o sítio ativo (VIRADOR et al., 2010).

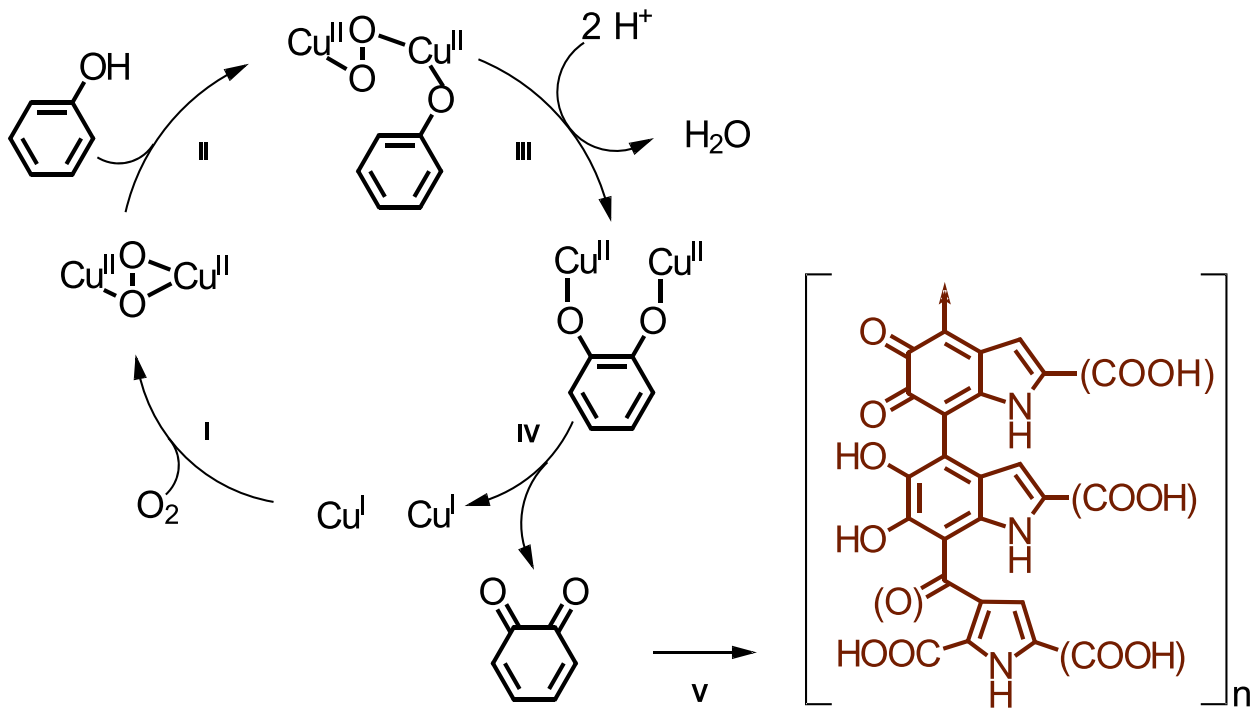


Figura 2 – Mecanismo geral proposto de formação de melaninas catalisada por polifenoloxidase, destacando duas fases principais: uma fase enzimática (etapas de I a IV), em que, após ligação de um monofenol aos dois átomos de cobre (Cu^{II}) do sítio ativo da PFO, oxida-se à *o*-quinona, e uma fase química (etapa V), em que as *o*-quinonas se polimerizam espontaneamente, formando eumelaninas. Fonte: Os autores, adaptado de Carletti Nervo e Cattivelli (2014), Gamez et al. (2001), Ging et al. (2002) e Güray (2009).

Outros produtos da ação das PFO apresentam importância biológica, como é o caso das *o*-quinonas, que estão relacionadas com a defesa de vegetais contra microorganismos patogênicos. Supõe-se que essa atividade esteja ligada à sua alta capacidade de reagir com vários compostos celulares importantes para o metabolismo do agente etiológico, como proteínas e enzimas (MELO; SHIMIZU; MAZZAFERA, 2006). Cicatrização de feridas em invertebrados e formação da cutícula em artrópodes também são papéis desempenhados pelos produtos da ação das PFO (FRONK et al., 2015; ITO et al., 2016; MELO; SHIMIZU; MAZZAFERA, 2006).

2.2 Importância industrial das PFO

Além da função biológica, melaninas e compostos intermediários resultantes da ação das PFO são importantes para as indústrias química, farmacêutica e de alimentos. Melaninas extraídas de fungos e vegetais são utilizadas como corantes naturais em formas farmacêuticas, cosméticos e em alimentos. Compostos intermediários da ação de tirosinases, como a dopaquinona, leucodopacromo e cisteinildopas, apresentam ação antioxidante e antimicrobiana, com potencial aplicação farmacológica (KHEMAKHEM et al., 2016; SUN et al., 2016; ZHU; HE; CHU, 2011).

As PFO são as principais enzimas responsáveis pelo escurecimento enzimático dos alimentos, como consequência da formação de melaninas. Em alguns alimentos, como cacau, café, chá fermentado e passas, esse processo é necessário para se alcançar a coloração característica. Nesses produtos, a formação do sabor e aroma também são dependentes da ação das PFO (AQUARONE, et al., 2001; DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). Por outro lado, em muitos alimentos, a ação indesejável dessas enzimas implica em rejeição pelo consumidor e pela indústria, já que a modificação da cor é utilizada como parâmetro indicativo de má qualidade (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010; YI et al., 2015; ZHOU et al., 2016

O escurecimento enzimático é comum em frutas, hortaliças, leguminosas, crustáceos, cogumelos comestíveis, sendo acelerada quando a estrutura desses alimentos é danificada (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010; YI et al., 2015; ZHOU et al., 2016). Para ajudar a entender o porquê dessa aceleração, considere-se a Figura 3, que mostra uma célula vegetal saudável, destacando algumas estruturas e organelas. Nessa célula, as PFO, produzidas nos ribossomos (1), são transportadas para os plastídeos (2), onde estão compartimentalizadas. Por sua vez, compostos fenólicos, incluindo os monofenóis e *o*-difenois (substratos das PFO), uma vez formados no retículo endoplasmático (3), são armazenados principalmente (cerca de 97 %) no vacúolo (4). O restante desses fenóis é transportado para a membrana plasmática (5). Então, dentro de uma célula vegetal intacta, membranas separam a enzima e o substrato, impedindo sua ação e formação das melaninas (SANTOS, 2009; TOIVONEN; BRUMMELL, 2008). Acontece que em matérias-primas alimentares de origem vegetal, injúrias nas estruturas

celulares quase sempre são inevitáveis durante sua cadeia de produção, seja por um dano físico ou bioquímico, expondo as PFO aos seus substratos e dando início ao processo de formação das melaninas. A descompartmentalização das PFO e dos fenóis ocorre, por exemplo, como consequência de operações unitárias de corte, descascamento, trituração e esmagamento. Isso explica porque em frutas e hortaliças minimamente processados, o escurecimento enzimático é acelerado em comparação à matéria-prima intacta (ALTUNKAYA; GÖKMEN, 2008; MANOLOPOULOU; VARZAKAS, 2011; SUKHONTHARA; THEERAKULKAIT, 2012; SULAIMAN et al., 2015).

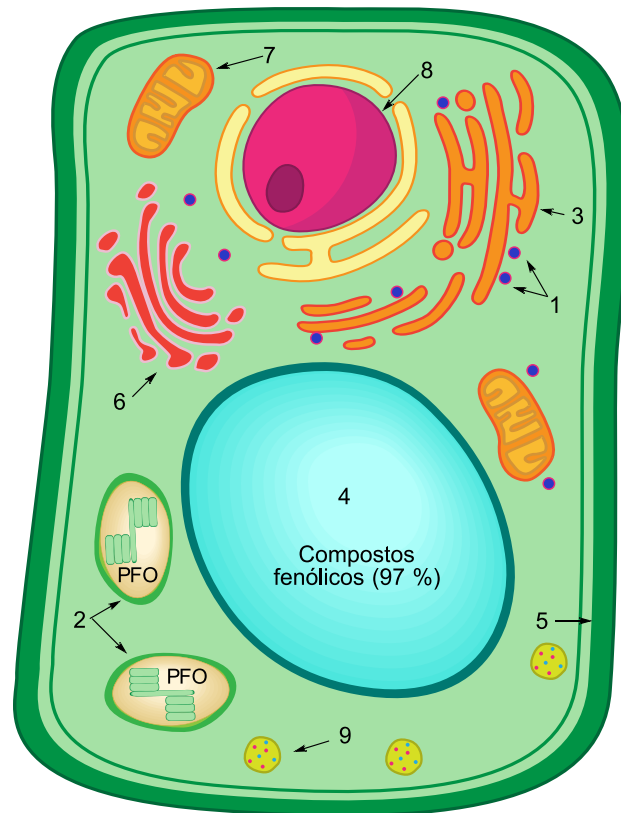


Figura 3 – Esquema de uma célula vegetal destacando algumas organelas: 1 = ribossomos, 2 = plastídeos (onde estão compartmentalizadas as PFO), 3 = retículo endoplasmático, 4 = vacúolo (onde cerca de 97 % dos compostos fenólicos estão armazenados), 5 = parede celular, 6 = complexo de Golgi, 7 = mitocôndrias, 8 = núcleo e 9 = lisossomo. Fonte: os autores, adaptado de Toivonen e Brummell (2008).

Em camarões e lagostas, durante o armazenamento *post-mortem*, melaninas são produzidas sob a carapaça do cefalotórax, causando o defeito de coloração conhecido como melanose (GONÇALVES; OLIVEIRA, 2016; NIRMAL; BENJAKUL, 2011). A atividade indesejável de PFO também tem impacto negativo sobre sabor e aroma em alguns alimentos, devido ao consumo de compostos fenólicos que desempenham papel importante na sensação de gostos amargos, doces, pungentes ou adstringentes. O valor nutricional pode ser afetado em função da ação das PFO, já que nutrientes como tirosina e ácido ascórbico podem ser oxidados (FRONK et al., 2015; SULAIMAN et al., 2015; YI et al., 2015; ZHOU et al., 2016).

2.3 Controle de PFO e do escurecimento enzimático em alimentos

Embora os problemas consequentes da ação de PFO não causem danos diretos à saúde do consumidor, eles depreciam as características sensoriais dos alimentos, implicando em perdas econômicas, razão porque são necessários procedimentos que os inibam (ALTUNKAYA; GÖKMEN, 2008; FRONK et al., 2015; MALLICK et al., 2011; NIRMAL; BENJAKUL, 2011). O uso de inibidores químicos é a estratégia industrial mais utilizada para esse fim, estando disponíveis substâncias que atuam em uma ou mais etapas do processo de produção de melaninas. Ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), metabissulfitos e sais de cisteína são os inibidores químicos mais comumente empregados (ALI et al., 2015; IOANNOU; GHOUL, 2013; MANOLOPOULOU; VARZAKAS, 2011; SULAIMAN et al., 2015; SUKHONTHARA; THEERAKULKAIT, 2012).

De uma forma simplificada, esses inibidores podem ser classificados em dois grupos principais quanto ao modo de ação: os inibidores de PFO e os agentes estabilizadores de *o*-quinonas. Enquanto que os primeiros atuam diretamente sobre as PFO, inibindo a formação das *o*-quinonas, os segundos atuam impedindo as reações não enzimáticas de polimerização. Vale ressaltar que um mesmo agente pode ser enquadrado em mais de uma classe, uma vez que alguns seguem mecanismos de ação múltiplos. Por exemplo, ácido ascórbico, sulfitos e L-cisteína podem agir tanto como agentes inibidores de PFO, quando estabilizador de *o*-quinonas (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010; WEEMAES et al., 1997).

Ácido cítrico, ácido ascórbico, EDTA e fosfatos atuam como inibidores competitivos de PFO. Eles atuam diretamente no sítio ativo das PFO, quelando os metais cobre, bloqueando-os, impedindo a ligação dos substratos. Ácido cítrico e ascórbico, demonstram um segundo efeito inibitório sobre as PFO, ao reduzir o pH do meio e reduzir a sua estabilidade termodinâmica (ALTUNKAYA; GÖKMEN, 2008; CHANG, 2009; IOANNOU; GHOUL, 2013; MA et al., 2010).

Para se entender como agem os estabilizadores de *o*-quinonas, é importante conhecer algumas das suas propriedades químicas. As quinonas apresentam na sua estrutura grupos carbonilas α,β -insaturados, cada um representando um sistema de Michael (Figura 4). Sendo sistemas conjugados, esses grupos sofrem ressonância, mostrando dois sítios eletrofílicos, um no carbono β e um no carbono da carbonila. Esses sítios são determinantes na etapa de polimerização não enzimática das *o*-quinonas, momento em que, por meio de reações de adição nucleofílica, inicia-se a formação das melaninas em alimentos (ALI et al., 2015; UNNADKAT, 2011; VOLLHARDT; SCHORE, 2009).

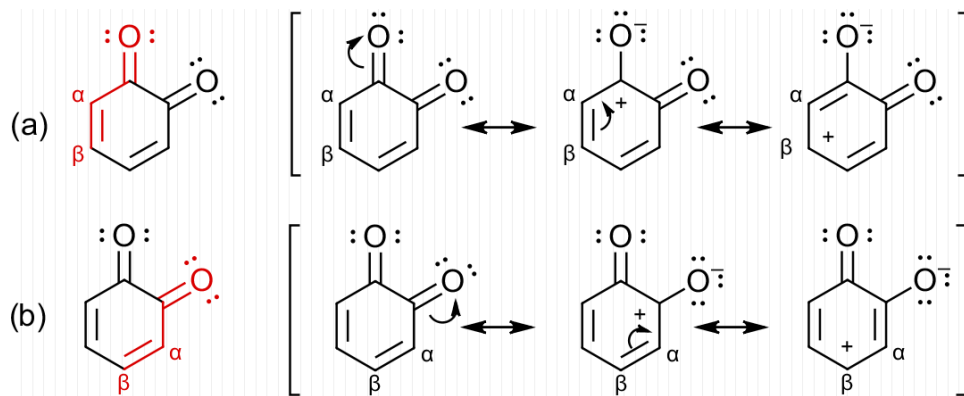


Figura 4 - Estrutura de uma *o*-quinonas, mostrando em (a) e (b) os carbonos α e β de cada grupo carbonila α,β -insaturado (sistemas de Michael), e respectivas formas de ressonância. Fonte: adaptado de Vollhardt e Schore (2009).

A extinção desses sítios eletrofílicos pelos agentes estabilizadores de *o*-quinonas impede o surgimento da coloração escura resultante da ação de PFO em alimentos. Conforme o modo de estabilização, esses agentes são classificados como nucleofílicos,

que se adicionam diretamente aos carbonos eletrofílicos, ou redutores, que, via processo de óxidorredução, convertem as *o*-quinonas nos compostos fenólicos correspondentes, (ALI et al., 2015; DANILEWICZ, 2011; OLIVEIRA et al., 2011; UNNADKAT, 2011; WEDZICHA, 1984). Dentre os agentes nucleofílicos, o dióxido de enxofre e seus sais derivados (sulfito de potássio, bissulfito de sódio, metabissulfito de sódio e metabissulfito de potássio) são os mais eficientes. Em solução aquosa, essas espécies se encontram em equilíbrio químico (Figura 5). A proporção relativa de cada uma dessas formas depende do pH do meio, da força iônica e da concentração inicial de cada espécie, sendo que no pH próximo ao dos alimentos, pH ácido, predomina o íon bissulfito (DANILEWICZ, 2007; MAIA; LIMA; FREITAS, 2006; SCRIMGEOUR et al., 2015; TÜRKE et al., 2012; WEDZICHA, 1984).

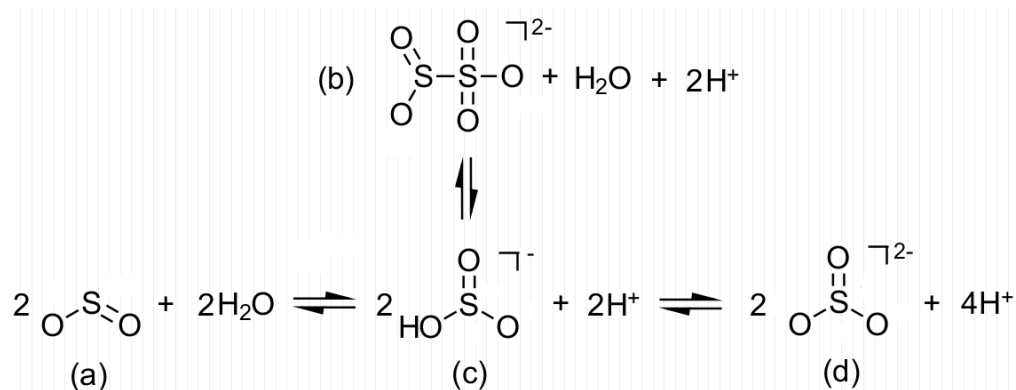


Figura 5 - Equilíbrio iônico em solução aquosa entre dióxido de enxofre (a), metabissulfito (b), bissulfito (c) e sulfito (d) em pH ácido (>2 e ≤7). Fonte: Adaptado de Maia, Lima e Freitas (2006), Scrimgeour et al. (2015), Türke et al. (2012) e Wedzicha (1984).

Os íons sulfito podem estabilizar as *o*-quinonas através do ataque aos carbonos eletrofílicos (carbonos β e carbonílico), por meio do seu átomo de enxofre (sítio nucleofílico), dando compostos de adição do tipo 1,4-Michael (Figura 6, etapas de V'' a IX) e 1,2-Michael (Figura 7, etapas de V'' a IX), respectivamente. No caso da adição nucleofílica tipo 1,2-Michael, o aduto formado (Figura 7, composto c), sofre reações posteriores de eliminação (Figura 7, etapas VIII a IX), devido a um impedimento estérico do grupo sulfurado pelo grupo hidroxila adjacente, formando o catecol correspondente (DANILEWICZ; WALLBRIDGE, 2010; DANILEWICZ, 2011). Como consequência da

adição nucleofílica, a fase química de polimerização das *o*-quinonas com formação das melaninas (Figuras 6 e 7, etapa V') é inibida. (DANILEWICZ; WALLBRIDGE, 2010; DANILEWICZ, 2011).

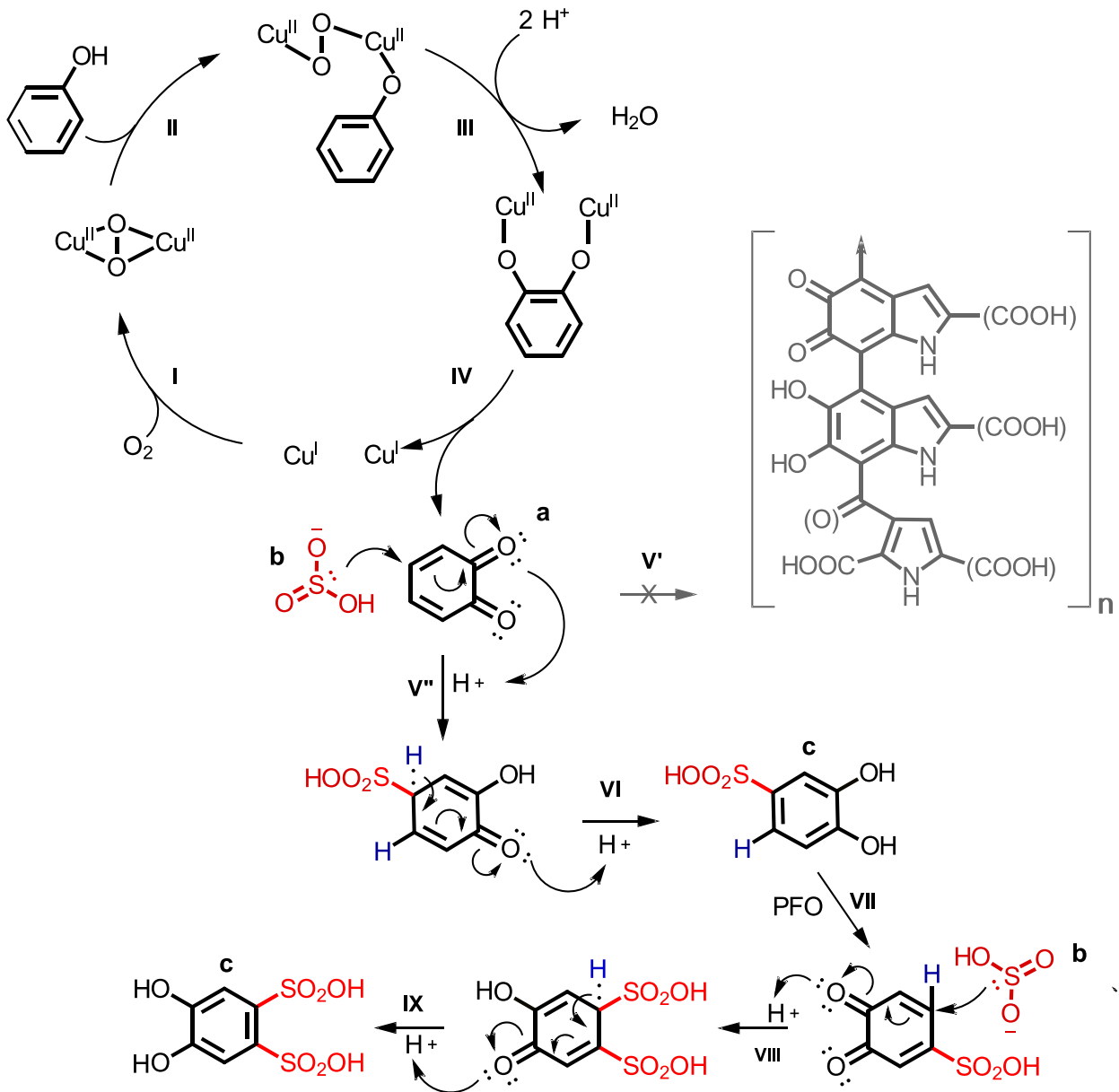


Figura 6 - Mecanismo proposto de estabilização de *o*-quinonas (a) por bissulfito (b) em alimentos, via reação de adição nucleofílica (etapas entre V'' a IX), dando adutos do tipo 1,4-Michael (c). Dado: PFO = polifenoloxidase. Fonte: adaptado de Ali et al. (2015), Danilewicz (2007), Ging et al. (2002).

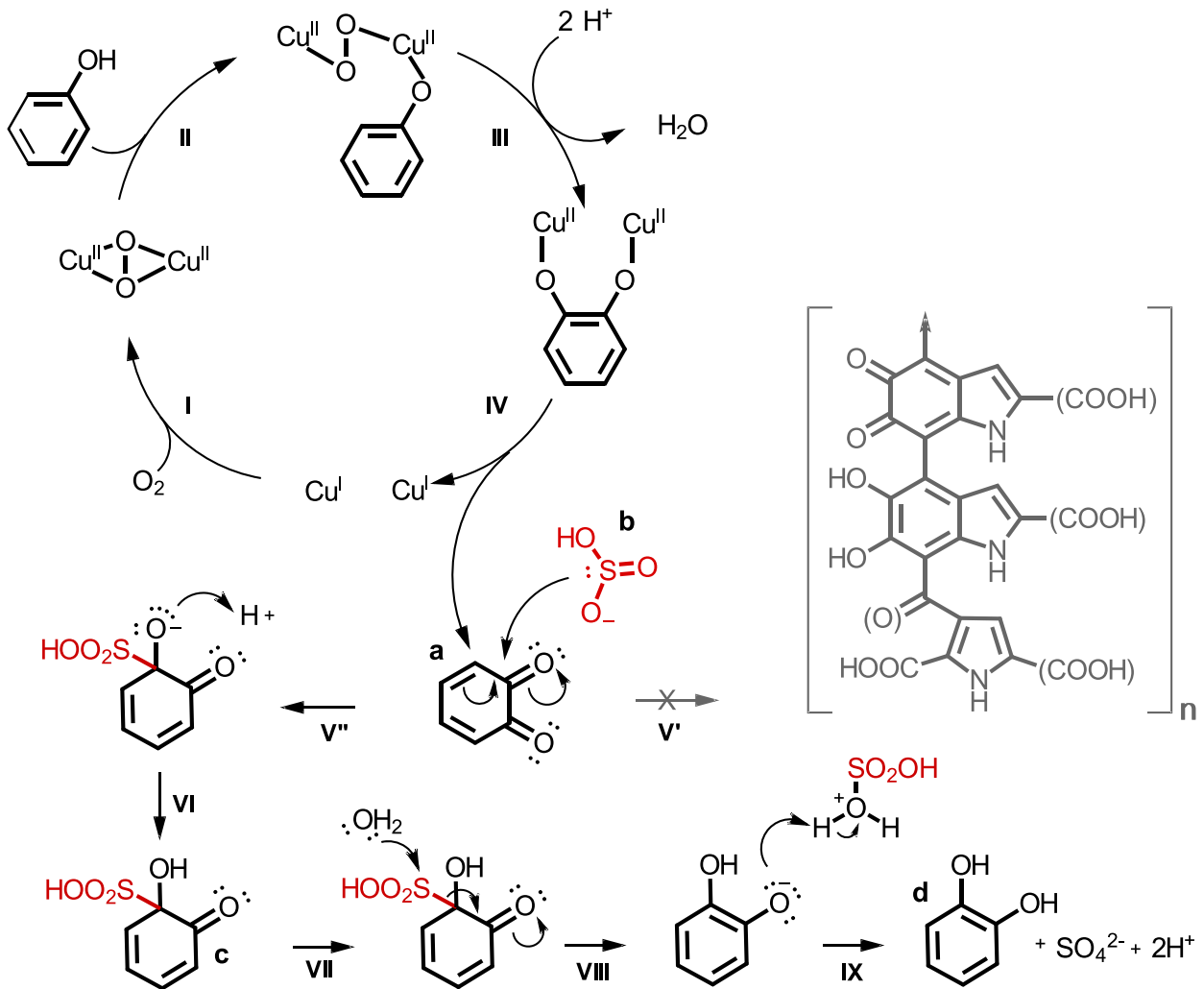


Figura 7 - Mecanismo proposto de estabilização de *o*-quinonas (a) por bissulfito (b) em alimentos, via reação de adição nucleofílica, dando aduto do tipo 1,2-Michael (c). O aduto sofre reações subsequentes de eliminação (etapas VIII a IX), formando um *o*-catecol correspondente (d). Dado: PFO = polifenoloxidase. Fonte: adaptado de Danilewicz (2007), Danilewicz (2011), Ging et al. (2002).

Outros aditivos sulfurados, como o aminoácido L-cisteína e seus sais também são utilizados como agentes antiescurecimento em frutas e hortaliças. A Figura 8 demonstra um dos possíveis mecanismos de ação desse aminoácido, semelhante ao dos sulfitos, em que a produção de melaninas é bloqueada. A partir do seu grupo tiol (sítio nucleofílico), o ataque de L-cisteína à quinona ocorre preferencialmente ao carbono β , formando compostos do tipo 1,4-Michael (etapas de V'' a IV). Ao contrário das melaninas,

os produtos resultantes das reações entre σ -quinonas e compostos de enxofre são incolores (ALI et al., 2015; UNNADKAT, 2011).

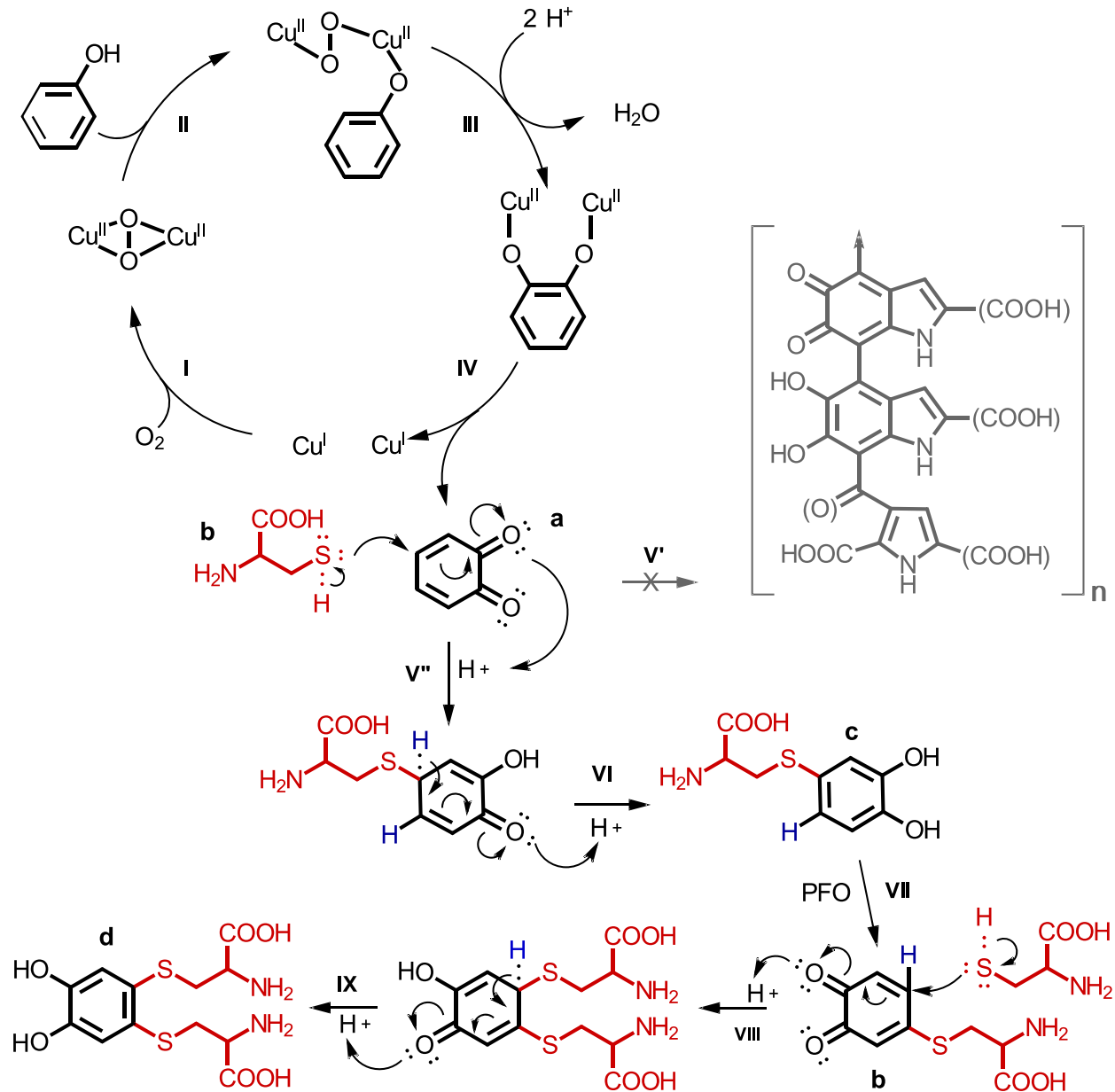


Figura 8 – Mecanismo proposto de estabilização de σ -quinonas (a) por L-cisteína (b) em alimentos, via reação de adição nucleofílica do tipo Michael 1,4 (etapas de V' a IX), formando tiotecoís incolores (c,d). Conseqüentemente, a etapa de polimerização das σ -quinonas (etapa V') é inibida. Fonte: adaptado de Ali et al. (2015), Ging et al. (2002).

Mesmo sendo esses aditivos bastante utilizados com tal finalidade pela indústria de alimentos, tem-se enfrentado limitações de caráter tecnológico e econômico quanto ao seu uso, podendo-se citar o alto custo do ácido ascórbico e da cisteína e a baixa eficiência do ácido cítrico. Do ponto de vista sensorial, o sabor residual deixado em produtos tratados com compostos de enxofre, como cisteína e sulfitos, tende a limitar a sua aceitação pelo consumidor (PEREZ-GAGO; SERRA; RÍO, 2006). Quanto à segurança, sulfitos e metabissulfitos são os aditivos alimentares mais frequentemente envolvidos em polêmicas, visto que muitos deles podem estar associados a efeitos adversos à saúde (SUKHONTHARA; THEERAKULKAIT, 2012; WEEMAES et al., 1997). Portanto, há um interesse de se estudar novos métodos químicos de inibição do escurecimento enzimático em alimentos, alinhados, ao mesmo tempo, à segurança, eficácia e eficiência. Nesse contexto, peptídeos bioativos oriundos de diferentes fontes naturais incluindo leite bovino (ABUBAKR, 2016; CHEN, et al., 2006), arroz (OCHIAI et al., 2016), trigo (CAMPAS-RÍOS et al., 2012; WANG et al., 2007), mel (ATES; PEKYARDIMCI; COKMUS, 2001), moluscos comestíveis (NAKCHUM; KIM, 2016; PRAKOT; CHAITANAWISUTI; KARNCHANATAT, 2015) e resíduos industriais do bicho-da-seda (PUANGPHET; TIYABOONCHAI; THONGSOOK, 2015; WU; WANG; XU, 2008) foram estudados mostrando potencial para aplicabilidade.

2.4 Peptídeos bioativos: atividade antioxidante e capacidade de inibição de PFO

Peptídeos bioativos são fragmentos específicos de proteínas, com impacto positivo sobre diversas funções nos organismos, incluindo atividade opioide, imunomodulatória, antineoplásica, anti-hipertensiva, anti-hipercolesterolêmica, antimicrobiana e antioxidante (BRANDELLI; DAROIT; CORRÊA, 2015; MOHANTY et al., 2016; SINGH; VIJ; HATI, 2014). Muitos deles demonstraram atividade antioxidante semelhante ou maior do que antioxidantes convencionalmente utilizados em alimentos, como o hidroxibutilanisol (BHA), hidroxibutiltolueno (BHT), galato de propila e alfa-tocoferol (CASTRO; SATO, 2015; MENDIS et al., 2005; MORA; et al., 2014; NAQASH; NAZEER, 2011; NAZEER et al., 2011; SHERIFF et al., 2014; WANG et al., 2013; ZHOU et al., 2015).

Apesar do mecanismo de ação antioxidante ainda não ter sido totalmente elucidado, há íntima correlação entre essa ação com o tamanho da cadeia peptídica, sua composição em resíduos aminoácidos e hidrofobicidade (NAZEER et al., 2011). Sugeriu-se que muitos peptídeos bioativos agem como doadores de prótons a radicais reativos, interrompendo a reação em cadeia da peroxidação lipídica (CAI et al., 2015; WANG et al., 2012; WANG et al., 2013), ou quelando metais catalisadores dessas reações de oxidação (GALLEGOS-TINTORÉ et al., 2011; GUZMÁN-MÉNDEZ et al., 2014; MEGÍAS et al., 2008). Resíduos dos aminoácidos tirosina, triptofano e fenilalanina, estariam diretamente relacionados ao potencial antioxidante desses peptídeos, já que o seu anel aromático e o grupo indol podem doar prótons (CAI et al., 2015; GUZMÁN-MÉNDEZ et al., 2014; HERNÁNDEZ-LEDESMA et al., 2005). Por sua vez, os resíduos de histidina seriam possíveis responsáveis pela quelação de metais, por meio do seu grupo lateral imidazol (GALLEGOS-TINTORÉ et al., 2011; GUZMÁN-MÉNDEZ et al., 2014; MEGÍAS et al., 2008).

A atividade antioxidante de peptídeos bioativos tem contribuído para explicar alguns achados sobre a sua capacidade de inibir o escurecimento enzimático em alimentos. Esses peptídeos poderiam atuar em uma ou em ambas as fases dessa modificação: tanto na fase enzimática, como inibidor de PFO, quanto na fase química, impedindo a polimerização das *o*-quinonas. Devido à sua capacidade de quelar metais cobres, os mesmos presentes no sítio ativo das PFO, eles poderiam atuar como inibidores competitivos dessas enzimas, bloqueando a formação das *o*-quinonas (ABUBAKR, 2016; NIE et al., 2017; VILLARAMA; MAIBACH, 2005; YI; DING, 2014). Na fase química, sugeriu-se que peptídeos contendo resíduos de cisteína apresentam ação semelhante ao dos compostos de enxofre, como sulfitos e L-cisteína, participando da estabilização das *o*-quinonas, via reações de adição nucleofílica ou de óxidorredução, impedindo, conseqüentemente, a formação das melaninas (SCHURINK et al., 2007).

Resíduos de histidina seriam possíveis responsáveis pela quelação de metais, por meio do seu grupo lateral imidazol (GALLEGOS-TINTORÉ et al., 2011; GUZMÁN-MÉNDEZ et al., 2014; MEGÍAS et al., 2008). Esse aminoácido estava presente em peptídeos com alta capacidade de inibição de PFO, conjuntamente com resíduos de fenilalanina, cisteína, triptofano, tirosina e arginina. A presença de resíduos de

fenilalanina (estruturalmente semelhante à tirosina, um substrato de PFO), na cadeia do peptídeo permitiria a sua acomodação e formação de uma interação forte com o sítio ativo da enzima, causando uma inibição competitiva (NIE et al., 2017; PUANGPHET; TIYABOONCHAI; THONGSOOK, 2015; WU; WANG; XU, 2008).

Peptídeos contendo resíduos de cisteína e/ou fenilalanina ocorrendo simultaneamente com resíduos aminoácidos apolares, como valina, alanina, leucina, histidina e triptofano, tiveram seu poder inibitório aumentado, uma vez que a hidrofobicidade facilitaria a sua entrada e bloqueio do sítio ativo das PFO, igualmente apolar (CAMPAS-RÍOS et al., 2012; NIE et al., 2017; NOH et al., 2009; PRAKOT; CHAITANAWISUTI; KARNCHANATAT, 2015; SCHURINK et al., 2007). Explicações satisfatórias sobre a importância da sequência de aminoácidos nesses peptídeos são insipientes, sendo necessários estudos aprofundados.

2.5 Produção e pesquisa de peptídeos com capacidade de inibição de PFO

Quanto à produção e identificação de peptídeos inibidores de PFO a maioria das pesquisas já realizadas voltou-se ao isolamento de espécies inatas em material orgânico ou síntese química (NIE et al., 2017; SCHURINK et al., 2007). Nos últimos anos, o processo de produção via hidrólise enzimática de diferentes fontes proteicas tem merecido atenção, apesar de serem escassos esses estudos (ABUBAKR, 2016; OCHIAI et al., 2016; SCHURINK et al., 2007). Esses peptídeos, formados por sequências específicas de aminoácidos, podem estar na forma latente dentro da cadeia proteica e, conseqüentemente, indisponíveis para o meio (YI; DING, 2014). A hidrólise enzimática causaria a exposição desses peptídeos ao meio, podendo interagir com uma molécula alvo e expressar sua ação. Essa suposição foi comprovada em trabalhos realizados ao longo dos últimos anos, quando se estudou a hidrólise de algumas fontes de proteínas, inclusive colágeno de lulas (NAKCHUM; KIM, 2016), sericina de resíduos da produção de seda (PUANGPHET; TIYABOONCHAI; THONGSOOK, 2015; WU; WANG; XU, 2008), proteínas do farelo de arroz (OCHIAI et al., 2016), albuminas do trigo (CAMPAS-RÍOS et al., 2012), glúten (WANG et al., 2007) e proteínas do leite (ABUBAKR, 2016). Todos esses trabalhos comprovaram que a hidrólise enzimática dessas proteicas resultou em

hidrolisados com maior atividade inibitória de PFO, comparativamente às proteínas nativas. Esses achados incentivam a prospecção de novos hidrolisados e peptídeos com atividade inibitória de PFO a partir de diferentes matérias-primas, inclusive resíduos industriais.

Quanto ao soro de leite, subproduto da fabricação de queijos e caseínas, pouco se sabe sobre a sua capacidade inibitória sobre o escurecimento enzimático de alimentos. Um estudo recente sugeriu que as proteínas de um concentrado proteico do soro de leite (WPC) bovino inibiam as duas fases do escurecimento enzimático de alfaces. Na fase enzimática, essas proteínas pareceram inibir as PFO por um mecanismo de ação diferente do apresentado anteriormente, via imobilização do substrato (os compostos fenólicos). Possivelmente, interações múltiplas fenol-proteína, incluindo ligação de hidrogênio e interações de Van Der Waals, bloquearam o substrato, o qual, por sua vez, ficou indisponível para participar das reações de oxidação catalisadas pelas PFO. Possivelmente, na fase química, resíduos de cisteína presentes na superfície globular dessas proteínas estabilizavam as *o*-quinonas, impedindo a formação das melaninas e mudança da cor na superfície do vegetal. O autor sugere novos estudos visando melhorar a eficiência do soro de leite como aditivo natural destinado ao controle de escurecimento enzimático em alimentos (ALTUNKAYA, 2011). O processo de hidrólise enzimática do soro de leite seria, então, uma estratégia a ser avaliada, até então não abordada na literatura.

2.6 Soro de leite de búfala como substrato para a produção de peptídeos bioativos

O soro de leite de diferentes espécies apresenta quantidade importante de proteínas, próximo de 1% (Tabela 1) (NAWAZ; MASUD; SAMMI, 2011; RATHI et al., 2015; YAZICI; AKBULUT, 2007), despertando o interesse pelo seu uso como fonte de peptídeos bioativos (BRANDELLI; DAROIT; CORRÊA, 2015; CORRÊA et al., 2014; YADAV et al., 2015). Para esse fim, o soro de leite da espécie bovina mereceu maior atenção em comparação ao de outros animais. A razão para isso é clara: o rebanho bovino responde por cerca de 85 % da produção mundial de leite (CLAEYS et al., 2014), sendo a produção mundial do subproduto estimada em cerca de 180 a 190 milhões

toneladas por ano (YADAV et al., 2015). Nos últimos anos, os soros de leite de cabra (*Capra hircus*) e de ovelha (*Ovis aries*) também se mostraram importantes fontes de isolamento e produção de hidrolisados e peptídeos com atividade antioxidante e antimicrobiana (BRANDELLI; DAROIT; CORRÊA, 2015).

Tabela 1 - Composição comparativa do soro de leite bovino e bubalino, resultante da fabricação de queijo Mozzarella. ¹Adaptada de (1)Yazici e Akbulut (2007); (2) Nawaz; Masud e Sammi (2011); (3) Rathi et al. (2015); (4) Teixeira e Fonseca (2008); (5) Rektor e Vatai (2004); Maciel e Waszczynskij (1998).

Soro de leite	Sólidos totais	Proteínas	Lactose	Gordura	Cinzas	Referência ¹
Bubalino	6,20 – 6,75	0,77 – 0,86	4,76 – 5,27	0,15 - 0,20	0,42 – 0,55	(1)
	7,25 – 7,28	0,9 – 1,21	4,74 - 5,45	0,30 – 0,77	0,53 – 0,63	(2)
	6,94	0,91	4,07	1,51	0,45	(3)
Bovino	6,33	0,84	4,42	0,77	0,47	(4)
	5,87	0,72	3,9	0,79	0,46	(5)
	7,07	1,03	4,55	0,71	0,78	(6)

Comparativamente ao soro de leite desses animais, o soro de leite de búfala recebeu menor atenção, como fonte de peptídeos bioativos, mesmo sendo essa a segunda maior espécie leiteira do mundo, respondendo por cerca de 11 % da produção de leite. Os poucos trabalhos realizados até agora se centraram no isolamento e identificação de peptídeos bioativos do soro de leite de búfala, liberados naturalmente durante a produção de queijo mozzarella (DE SIMONE et al., 2009) e na extração de peptídeos bioativos desse queijo (RIZZELLO et al., 2005). Um trabalho recente revelou o queijo Mozzarella di Bufala Campana como uma boa fonte de peptídeos bioativos após sua digestão gastrointestinal *in vitro* (TENORE et al., 2015). Entretanto, não foram encontrados estudos sobre propriedades bioativas de hidrolisados proteicos de proteínas do soro de leite de búfala, utilizando-se peptidases. Tão pouco, há relatos sobre estudos avaliando a atividade inibitória de PFO e do escurecimento enzimático de alimentos desse soro hidrolisado.

As estruturas primárias das proteínas do leite de leite bovino, caprino, ovino e bubalino apresentam grande homologia entre si. Nesse sentido, aparentemente, a hidrólise enzimática da fração proteica desses soros, utilizando-se a mesma protease, resultaria em hidrolisados e peptídeos com propriedades bioativas idênticas (HERNÁNDEZ-LEDESMA; RAMOS; GÓMEZ-RUIZ, 2011). Entretanto, estudos têm mostrado o contrário: hidrolisados e peptídeos do soro de leite de diferentes espécies têm apresentado diferentes propriedades bioativas, mesmo sendo produzidos sob condições catalíticas semelhantes (AHMED et al., 2015). Esse fato ocorre porque, apesar da homologia, algumas diferenças estão presentes na composição (Tabela 2) (DIXIT; KK; SINGH, 2012) e sequência de aminoácidos dessas proteínas (Figura 9) (CZERWENKA; MÜLLER; LINDNER, 2010).

Desconformidades estruturais foram observadas entre os C e N-terminal da β -Lactoglobulina do soro de leite de búfala e os C e N-terminal da β -Lactoglobulina do soro bovino (EL-SALAM; EL-SHIBINY, 2011). Além dos C e N-terminais, observaram-se desigualdade em 2 resíduos aminoácidos no interior da estrutura primária dessa proteína (Figura 9) (CZERWENKA; MÜLLER; LINDNER, 2010). Diferenças entre as estruturas secundárias das β -Lactoglobulinas do soro de leite desses animais também foram verificadas (Tabela 2) (DIXIT; KK; SINGH, 2012). El-Salam e El-Shibiny (2011) relataram diferença entre a α -Lactalbumina do soro de leite bubalino e a α -Lactalbumina do soro de leite bovino, em apenas um resíduo de aminoácido.

Em função dessas pequenas discrepâncias estruturais, é provável que as proteínas do soro de leite de búfala sejam uma fonte diferenciada de peptídeos bioativos a ser estudada, considerando-se que a sequência específica de aminoácidos afetam as propriedades de peptídeos bioativos (BAH et al., 2015; NAJAFIAN; BABJI, 2014). A partir desse subproduto, é provável se obter peptídeos com características diferenciadas, comparativamente aos obtidos a partir do soro de leite de vaca e de outros animais já estudados (EL-SALAM; EL-SHIBINY, 2013). Para tanto, há necessidade de estudos com tal enfoque.

Tabela 2 - Composição comparada do perfil de aminoácidos (%) da β -Lactoglobulina do soro de leite bovino (*Bos Taurus*), bubalino (*Bubalus bubalis*), caprino (*Capra hircus*) e ovino (*Ovis aries*). Fonte: Adaptado de Dixit, KK e Singh (2012).

Aminoácidos	β -Lactoglobulina			
	Vaca	Búfala	Cabra	Ovelha
Alanina	10,70 %	11,10 %	11,10 %	11,10 %
Arginina	1,70 %	1,70 %	1,70 %	1,70 %
Asparagina	2,80 %	2,80 %	3,30 %	3,90 %
Aspartato	5,60 %	5,60 %	4,40 %	4,40 %
Cisteína	3,90 %	3,90 %	3,90 %	3,90 %
Glutamina	5,60 %	5,60 %	5,60 %	5,60 %
Glutamato	9,00 %	8,90 %	8,30 %	8,30 %
Glicina	2,80 %	3,30 %	3,90 %	3,90 %
Histidina	1,10 %	1,10 %	1,10 %	1,70 %
Isoleucina	5,60 %	5,60 %	6,10 %	5,60 %
Leucina	15,20 %	15,00 %	15,00 %	15,00 %
Lisina	9,00 %	8,90 %	9,40 %	8,90 %
Metionina	2,80 %	2,80 %	2,80 %	2,80 %
Fenilalanina	2,20 %	2,20 %	2,20 %	2,20 %
Prolina	4,50 %	4,40 %	4,40 %	4,40 %
Serina	3,90 %	3,90 %	3,30 %	3,30 %
Treonina	5,10 %	4,40 %	4,40 %	4,40 %
Triptofano	1,10 %	1,10 %	1,10 %	1,10 %
Tirosina	2,20 %	2,20 %	2,20 %	1,70 %
Valina	5,10 %	5,60 %	5,60 %	6,10 %

2.7 Situação mundial da produção de leite e soro de leite de búfalo

Búfalo é a segunda maior espécie leiteira do mundo, respondendo por cerca de 11 % da produção de leite, enquanto que o leite bovino responde por 85 %. As demais espécies leiteiras representam menos de 4,2 % da produção mundial. Em 2013, a produção mundial de leite de búfala superou 80 bilhões de litros contra cerca de 750 bilhões de litros de leite bovino. Em uma década, no período de 2003 a 2013, o índice de crescimento da população bubalina leiteira cresceu quase 24 %, com previsão de

produção de queijos, os quais são um dos principais produtos do destino do leite dessa espécie (CACCIÒ et al., 2007; CALABRÒ et al, 2014). Não há dados conclusivos sobre a produção mundial de soro de leite de búfala, mas pode-se estimar a taxa de crescimento da sua produção indiretamente, a partir de dados da produção de queijos produzidos com esse leite. Entre os anos 2001 e 2011, estimou-se o crescimento da produção mundial desses queijos numa taxa de cerca de 8,1 %. Nesse mesmo período, Ásia e África, que responderam pela produção mundial de cerca de 90 %, tiveram um acréscimo de cerca de 14,8 % e 7,5 % (FAOSTAT, 2015). A produção de soro de leite de búfala deve seguir taxas semelhantes às anteriormente citadas, uma vez que sua produção tem relação direta com a produção de queijos (SCOTT, 1991).

Sendo que esse subproduto conserva cerca da metade dos nutrientes do leite, ele apresenta alta demanda biológica de oxigênio (DBO). Então, seu descarte sem tratamento prévio poderia acarretar em impacto ambiental, dependendo do volume liberado. O tratamento prévio nem sempre é aprovado pela indústria de alimentos, já que ele requer investimento financeiro com sistemas de tratamento de efluentes, energia e responsabilidade técnica. Além disso, proteínas de alto valor biológico, carboidratos e sais minerais, componentes que poderiam ser aproveitados economicamente, como nutrientes e ingredientes funcionais, seriam perdidos como consequência do seu descarte. Portanto, alternativas rentáveis e sustentáveis de aproveitamento industrial do soro de leite devem ser estudadas. O seu emprego como substrato para a produção de produtos de valor agregado, como aditivos alimentares e compostos bioativos, é prática racional para o seu aproveitamento (MIRABELLA; CASTELLANI; SALA, 2014; REBOUILLAT; ORTEGA-REQUENA, 2015).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão encontram-se na forma do artigo intitulado “Buffalo cheese whey hydrolyzed with alcalase as an antibrowning agent in minimally processed apple”, submetido para publicação no Journal of Food Science and Technology. O artigo (seção 3.1) está formatado conforme normas do Journal e o seu comprovante de submissão encontra-se no ANEXO.

3.1 Artigo

Buffalo cheese whey hydrolyzed with alcalase as an antibrowning agent in minimally processed apple

José Dilson Francisco da Silva^{1,2}, Ana Paula Folmer Correa¹, Carolina Pereira Kechinski,² Adriano Brandelli^{1,*}

¹ Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS);

² Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA)

* Corresponding author

Abstract

In this work, the ability to inhibit the browning of minimally processed apples by Alcalase-hydrolysed buffalo whey at different times, t_i ($i = 0, 0.5, 1, 2, 3, 4$ or 6 h) was investigated. The hydrolysis process was followed by determination of the degree of hydrolysis (DH). In order to understand possible modes of action on the enzymatic browning, the whey was submitted to the analysis of the antioxidant activity (ABTS•+ radical sequestration, Fe^{2+} chelating activity and reducing power), reactivity with quinones and inhibitory activity on polyphenoloxidases (PPO) extracted from *Red Delicious* apples. Buffalo whey shows significant increase ($P < 0.05$) in degree of hydrolysis, antioxidant activity, reactivity with quinones and PPO inhibitory activity as a function of the hydrolysis time. Specifically for the PPO inhibitory activity, the t_{4h} hydrolyzate reached about 50% inhibition peak. As for the ability to inhibit the browning of the minimally processed apples, the hydrolyzate kept the L^* parameter of the apples during 6 days of storage, not statistically differing ($P > 0.05$) from the metabisulfite. In addition to the luminosity, the hydrolyzed whey was able to maintain the browning index of the apples at lower values during this storage time compared to the unhydrolyzed whey ($P < 0.05$). These results evidencie data on possible applications of hydrolysed buffalo whey with Alcalase as a natural substitute for additives conventionally used in the control of this type of browning in foods.

Key words: bioactive peptides; natural food additive; color stability

Introduction

Enzymatic browning is one of the major problems in the food production chain, and it primarily affects fruits, vegetables, legumes, crustaceans, and edible mushrooms that are either processed or not processed. As a consequence of the color change, which is a parameter that indicates poor quality, economic losses and reduction of commercial value are implied (Gonçalves and Oliveira 2016; Nirmal and Benjakul 2011; Sulaiman et al. 2015; Sukhonthara and Theerakulkait 2012). The use of chemical inhibitors is the most commonly used industrial strategy to control enzymatic browning, and substances that act in one or more stages of this modification are available. In this case, citric acid, ascorbic acid, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), metabisulfites and cysteine salts are the most commonly used chemical inhibitors (Ali et al. 2015; Ioannou and Ghoul 2013, Manolopouloy and Varzakas 2011; Sulaiman et al. 2015). However, these additives present some technological and economic limitations, including the high cost of ascorbic acid and cysteine as well as the low efficiency of citric acid. The residual taste left in products treated with sulfur compounds, such as cysteine and sulfites, tends to limit their acceptance by the consumer (Pérez-Gago et al. 2006).

From a toxicological point of view, sulfites and metabisulfites are the food additives that are most frequently involved in safety issues because many of them may be associated with adverse health effects (Sukhonthara and Theerakulkait 2012; Weemaes et al. 1997). Therefore, there is an increased interest in studying new chemical methods of inhibiting enzymatic browning in foods with the simultaneous goals of safety, efficacy and efficiency. In this context, bioactive peptides derived from different natural sources including milk (Abubakr 2016), rice (Ochiai et al. 2016), wheat (Campas-Ríos et al. 2012), honey (Ates et al. 2001), edible molluscs (Nakchum and Kim 2016), and sericin (Puangphet et al. 2015) have been studied, showing potential for applicability.

Regarding the production and identification of PPO-inhibiting peptides, most of the research that has already been done has focused on the isolation of inborn species in organic material or chemical synthesis (Nie et al. 2017; Schurink et al. 2007). In recent years, the production process through enzymatic hydrolysis of different protein sources has received much attention, although these studies are relatively rare (Abubakr 2016; Ochiai et al. 2016). These peptides, which are formed by specific amino acid sequences,

may be in a latent form within the sequence of a precursor protein chain (Yi and Ding 2014). Enzymatic hydrolysis would cause release of these peptides in the medium and allow them to interact with target molecules and express their biological activities. This assumption has been shown in studies conducted over the past years through hydrolysis of some food proteins, including wheat albumin (Campas-Ríos et al. 2012), gluten (Wang et al., 2007), squid collagen (Nakchum and Kim 2016), protein from rice bran (Ochiai et al., 2016), and milk proteins (Abubakr 2016). All these studies showed that the enzymatic hydrolysis of these proteins resulted in hydrolysates with higher PPO inhibitory activity than native proteins. These findings encourage the prospect of new hydrolysates and peptides with PPO inhibitory activity from different raw materials, including industrial byproducts such as whey, which is generated in large amounts from cheese and casein production.

A recent study suggested that proteins from bovine whey protein concentrate (WPC) inhibited two phases of the enzymatic browning of lettuces (Altunkaya 2011). In the enzymatic phase, whey proteins appeared to inhibit PPO by immobilizing the substrate (the phenolic compounds). It is possible that multiple phenol-protein interactions, including hydrogen bonding and Van der Waals interactions, blocked the substrate, which in turn became unavailable to participate in the oxidation reactions catalyzed by these enzymes. Additionally, it is possible that in the chemical phase, cysteine residues present on the globular surface of these proteins stabilized *o*-quinones, which prevented the formation of melanins and color changes in the plant surface. Thus, new studies on improving the efficiency of whey as a natural additive for the control of enzymatic browning in foods would be encouraged. The enzymatic hydrolysis of whey is a strategy that has yet to be evaluated and has not been addressed in earlier literature. Therefore, this study aimed to study PPO inhibitory activity from hydrolyzed buffalo whey at different times using alcalase and to verify its ability to inhibit the enzymatic browning of minimally processed apples.

Materials and Methods

Enzymatic hydrolysis of buffalo whey

Whey from buffalo milk was collected from the manufacture of mozzarella cheese from a dairy plant in the municipality of Glorinha, RS, Brazil. Samples were lyophilized and resuspended in Tris-HCl buffer (100 mmol L⁻¹, pH 8.0) at a concentration of 100 mg L⁻¹. The suspension was preheated to 50°C and an alcalase preparation (20000 U mL⁻¹, Novo Nordisk) was added in a proportion of 2% (v v⁻¹) when hydrolysis was initiated. The hydrolysis process occurred at 50°C in a water bath with reciprocal shaking, and 5 mL samples were collected at the specified intervals t_i ($i = 0, 0.5, 1, 2, 3, 4$ or 6 h). These samples were subjected to enzymatic inactivation at 90°C for 15 min, cooling to room temperature and then centrifugation (10,000 × g , 15 min). The supernatants were separated from insoluble materials and called hydrolysates. The hydrolysis process was followed by determination, in the hydrolysates, of the degree of hydrolysis (DH). The hydrolysates were freeze-dried (-57°C, 0.5 mmHg) in a lyophilizer (Liotop, model L101) and maintained at -20°C until use. This material was suspended in 200 mmol L⁻¹ phosphate buffer pH 6.6 to a concentration of 50 mg mL⁻¹. In order to understand possible modes of action on the enzymatic browning, the hydrolysates were submitted to the analysis of the antioxidant capacity (ABTS•⁺ radical scavenging, Fe²⁺ chelating activity and reducing power), reactivity with 1,4-naphthoquinone and inhibitory activity on polyphenoloxidases (PPO) extracted from *Red Delicious* apples.

Determination of the degree of hydrolysis (DH)

DH was determined using the method described by Hoyle and Merrit (1994) with modifications. The results were expressed as the ratio between the soluble protein content in trichloroacetic acid (TCA) and the final concentration of 10% (w v⁻¹) of the total protein in the substrate (Equation 1). Then, 200 µl aliquots of the hydrolysate were mixed with 200 µl of 20% TCA solution (w v⁻¹), followed by resting for 30 min, centrifugation (3000 × g , 20 min) and separation of the supernatant. This supernatant was submitted to analysis of the soluble protein content in TCA in mg mL⁻¹ using the method of Lowry et al. (1951) and using bovine serum albumin (BSA) as a standard. For the determination of the total protein content (mg mL⁻¹), the unhydrolyzed whey (substrate) was used in the Kjeldahl method and using the value 6.38 as the total nitrogen conversion factor for the protein total (AOAC, 1997).

$$\text{DH (\%)} = \left(\frac{\text{Soluble protein in TCA 10 \%, mg mL}^{-1}}{\text{Total Protein in substrate, mg mL}^{-1}} \right) \times 100 \quad (1)$$

ABTS•⁺ radical scavenging assay

This assay involves the generation of the chromophoric radical 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), ABTS•⁺, by the oxidation of ABTS with potassium persulfate (Re et al. 1999). This radical was produced by reaction between the stock solution of ABTS (7 mmol L⁻¹) and potassium persulfate (140 mmol L⁻¹ final concentration). This mixture was kept in the dark for 12 h at room temperature prior to use. For the assay, the ABTS•⁺ solution was diluted with 5 mmol L⁻¹ phosphate buffer pH 7.0 containing 150 mmol L⁻¹ NaCl, until an absorbance of 0.7 (± 0.02) at 734 nm was reached. Aliquots of 10 µL of the hydrolysate were mixed with 1 mL of the diluted ABTS•⁺ solution, and after 6 min of reaction, the absorbance was analyzed at 734 nm. The results were expressed as the capturing ability of the ABTS•⁺ (%) = [1 - (A A₀⁻¹)] × 100 radical, where A is the absorbance of the assay, and A₀ is the absorbance of the control.

Iron chelating activity

The Fe²⁺ chelating activity was evaluated using the method described by Chang et al. (2007), with some modifications. One milliliter samples were mixed with 3.7 mL of distilled water and 0.1 mL of FeSO₄ (Fe²⁺, 2 mmol L⁻¹) as well as 0.2 mL of ferrozine (5 mmol L⁻¹). This mixture was stirred and after 10 min, the absorbance was read at 562 nm. For the control, distilled water was used. The results were expressed as Iron chelating activity (%) = [1 - (A A₀⁻¹)] × 100, where A is the absorbance of the assay and A₀ is the absorbance of the control.

Reducing power

The reducing power of the hydrolysates was evaluated according to the methods of Duh et al. (1999). An aliquot of 2.5 mL of the hydrolysates was mixed with 2.5 mL of 10 g L⁻¹ potassium ferricyanide solution, and the mixture was incubated at 50°C for 20 min. After this incubation, 2.5 mL of 10% (w v⁻¹) TCA was added, followed by centrifugation at 3000

$\times g$ for 10 min. Then, 2.5 mL of the supernatant was mixed with 2.5 mL of distilled water and 0.5 mL of 10 mg mL^{-1} ferric chloride, and the absorbance at 700 nm was immediately measured. A high absorbance value of the reaction mixture indicated a high reducing power. Butylated hydroxytoluene (BHT) was used as the positive control.

Reactivity with quinones

The ability of the hydrolysates to react with quinones was determined by methodology described by Puangphet et al. (2015), with adaptations. For this, the absorbance of a solution containing 1,4-naphthoquinone was analyzed after adding the hydrolyzate. The test tubes contained $725 \mu\text{L}$ of 100 mmol L^{-1} phosphate buffer pH 6.5, $500 \mu\text{L}$ of whey hydrolysate and $500 \mu\text{L}$ of 1 mg mL^{-1} 1,4-naphthoquinone in methanol. After 60 s, the absorbance was measured at 390 nm. Tris-HCl buffer (100 mmol L^{-1} , pH 8.0) was used as a blank, replacing the hydrolyzate. Data was expressed as absorbance units. The observed absorption is inversely proportional to quinone reactivity.

PPO inhibitory activity

The methodology described by Puangphet et al. (2015) was followed with adaptations. *Red Delicious* apples purchased at a local market in Porto Alegre, RS, Brazil, were peeled and had the mesocarp reserved, which was used as the material for PPO extraction. The PPO extraction process consisted of grinding 10 g of tissue mixed with 20 mL of extractive solution (100 mmol L^{-1} phosphate buffer pH 6.5, containing 10 g L^{-1} polyvinylpyrrolidone), in a mortar. Then, the solution was filtered through hydrophilic cotton, and the filtrate was centrifuged at $6000 \times g$ for 15 min at 4°C . The supernatant (enzyme extract) was maintained at 5°C in an ice bath and used immediately for the evaluation of inhibitory activity. For this analysis, $25 \mu\text{L}$ of the enzyme extract was transferred into test tubes containing $500 \mu\text{L}$ of whey hydrolysate, $500 \mu\text{L}$ of 0.175 mol L^{-1} pyrocatechol and $725 \mu\text{L}$ of 100 mmol L^{-1} phosphate buffer pH 6.5. The absorbance at 420 nm was measured after 60 s of reaction. Phosphate buffer was used as a blank control. The results were expressed as inhibitory activity of PPO (%) = $[1 - (A/A_0)] \times 100$, with A being the absorbance of the assay containing the hydrolysate, and A_0 the absorbance of the control.

Antibrowning ability in minimally processed apples

At this stage, t_{4h} hydrolyzed buffalo whey, which achieved maximum antioxidant and PPO inhibitory activities, was tested. The lyophilized hydrolysate was dissolved in 100 mmol L^{-1} phosphate buffer pH 6.5 (1.25 %, m v^{-1} , total protein) and was reserved for application to apples. The fruits of the *Red Delicious* variety were purchased at the local market of Porto Alegre, RS, Brazil. They were washed in potable water, sanitized in 200 ppm sodium hypochlorite aqueous solution, cut into slices (50 mm diameter by 5 mm thickness) and immediately immersed for 15 min in the t_{4h} hydrolysate solution. For comparison, under the same conditions, apple slices were immersed in 100 mmol L^{-1} phosphate buffer pH 6.5 (control), 12.5 g L^{-1} sodium metabisulfite dissolved in phosphate buffer (100 mmol L^{-1} , pH 6.5), or in 10 % (m v^{-1}) (1.25% m v^{-1} total protein) unhydrolyzed whey in phosphate buffer (100 mmol L^{-1} , pH 6.5). After immersion, the samples were centrifuged (Dynasty centrifuge, Jumbo model) for 5 min, packed in a low density polyethylene (LDPE) package (average thickness of 0.08 mm) with a ziplock closure and stored under refrigeration at 7°C for up to 6 days. During this time ($t = 0, 1, 2$ or 6 d), samples were submitted to color analysis in triplicate, using a colorimeter (Minolta® Chrona Meter CR400). The parameters evaluated were a^* , which characterizes coloring in the region from red to green, b^* , which indicates coloring in the range from yellow to blue, and L^* , which provides brightness ranging from white to black. From the color parameters, the browning index (BI) was calculated based on Equation 2 (Data: a_t^* = parameter a at time t d; a_0^* = parameter a at time 0 d; L_t^* = parameter L at time t d; b_t^* = Parameter b at time t d) (Bal et al. 2011).

$$BI = \left\{ \frac{\left[\left(\frac{a_t^* + 1,75 L_t^*}{5,645 L_t^* + a_0^* - 3,012 b_t^*} \right) - 0,31 \right]}{0,17} \right\} \times 100 \quad (2)$$

Statistical analyses

All data were collected in triplicate, submitted to Analysis of Variance (ANOVA) and Tukey's test at the 5% significance level using the Action Stat software version 3.1.43.706.675 (ESTATCAMP, 2016).

Result and Discussion

The results of the characterization of the hydrolysates in relation to DH and the antioxidant capacity are depicted in Figure 1. A significant increase ($P < 0.05$) in DH was observed over the time of hydrolysis, consequently accompanied by an increase in the antioxidant activity of buffalo whey. The Fe^{2+} chelation activity reached maximum values after 3 h of hydrolysis, remaining stable after this time. In addition, the ABTS \cdot^+ radical scavenging activity and the reducing power achieved maximum values after 4 h of hydrolysis. Likewise, analyzes of PPO inhibitory activity and quinone reactivity (Figure 2) demonstrated growth as a function of hydrolysis time and DH increase. The maximum of PPO inhibitory activity was observed from 4 h hydrolysis, when the initial PPO activity was reduced to about 50%.

The parameters PPO inhibitory activity and quinone reactivity indicate possible mechanisms of action of the hydrolyzed whey on the enzymatic browning of foods. Inhibitors of PPO prevent the formation of *o*-quinones, whereas quinone reactivity agents stabilize them via reduction and addition reactions, interrupting the polymerization step to melanins. It is worth emphasizing that the same agent can be framed in more than one class, since some follow multiple mechanisms of action. As examples of inhibitors of the enzymatic browning of multi-acting foods, commercially used citric acid, ascorbic acid, sulfites and L-cysteine (Altunkaya and Gökmen 2008; Chang 2009; Ioannou and Ghoul 2013; Ma et al 2010; Damodaran et al 2010; Weemaes et al 1997).

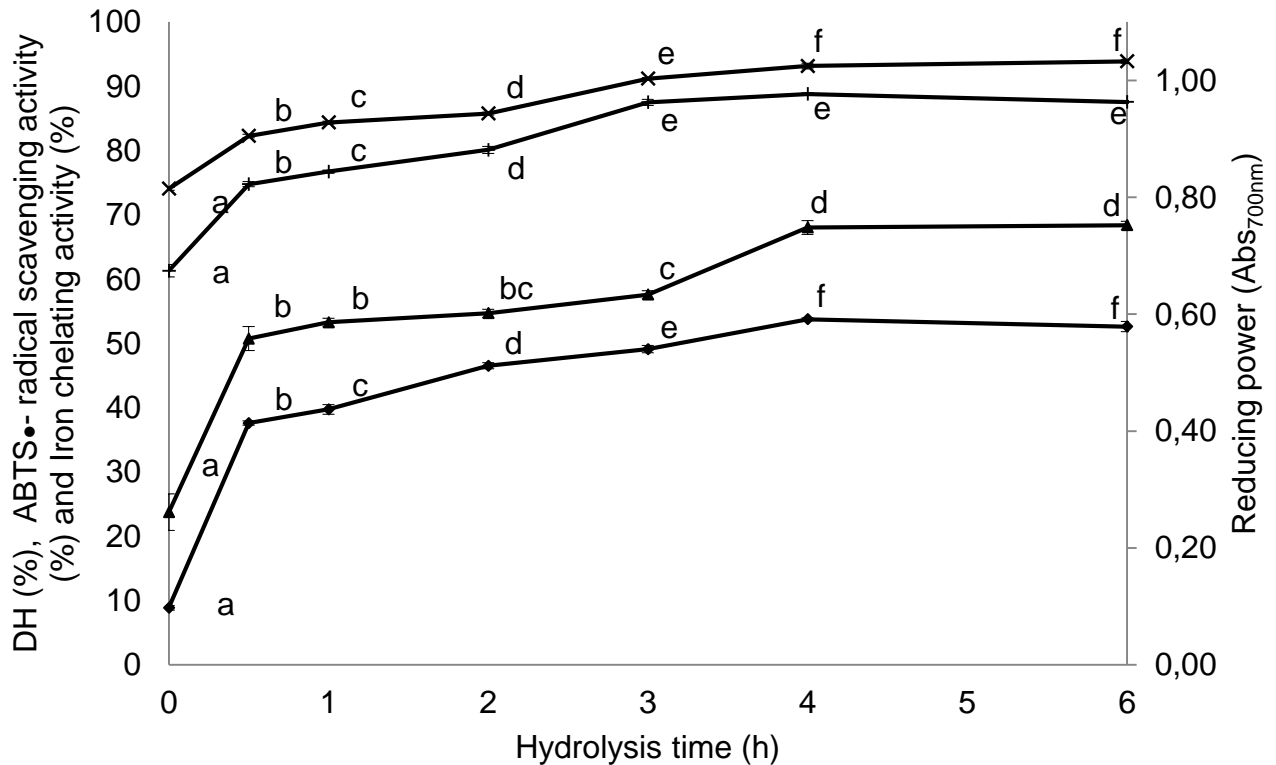


Figure 1. Characterization of the buffalo whey during the hydrolysis with Alcalase in terms of the degree of hydrolysis (DH, ▲, %), and in relation to the antioxidant activity measured by ABTS•⁺ radical scavenging activity (◆, %), iron chelating activity (+, %), and reducing power (x, Abs_{700nm}). Values are the means ± standard deviations of three independent experiments. Data on the same line accompanied by different letters differ statistically from each other by the Tukey test ($P < 0.05$).

Naturally, proteins may exhibit antioxidant activity and PPO inhibition capacity (Altunkaya 2011; Perez-Gago et al 2006). Some studies have shown that there is a positive correlation between these properties since they may follow similar mechanisms of action, such as chelating and reducing activity. It is likely that the amino acid sequences on the surface of these proteins act in more than one of the stages of melanin formation, including inhibiting PPO or stabilizing their products, *o*-quinones. The inhibition of PPO may occur due to the ability to chelate the copper metals from PPO active site, while the reduction occurs due to their ability to stabilize the *o*-quinones (Kubglomsong and Theerakulkait 2014; Yi and Ding 2014; Nakchum and Kim 2016). Amino acid sequences

containing histidine residues could be responsible for the chelation of metals through an imidazole side group (Gallegos-Tintoré et al 2011; Guzmán-Méndez et al 2014; Megías et al 2008).

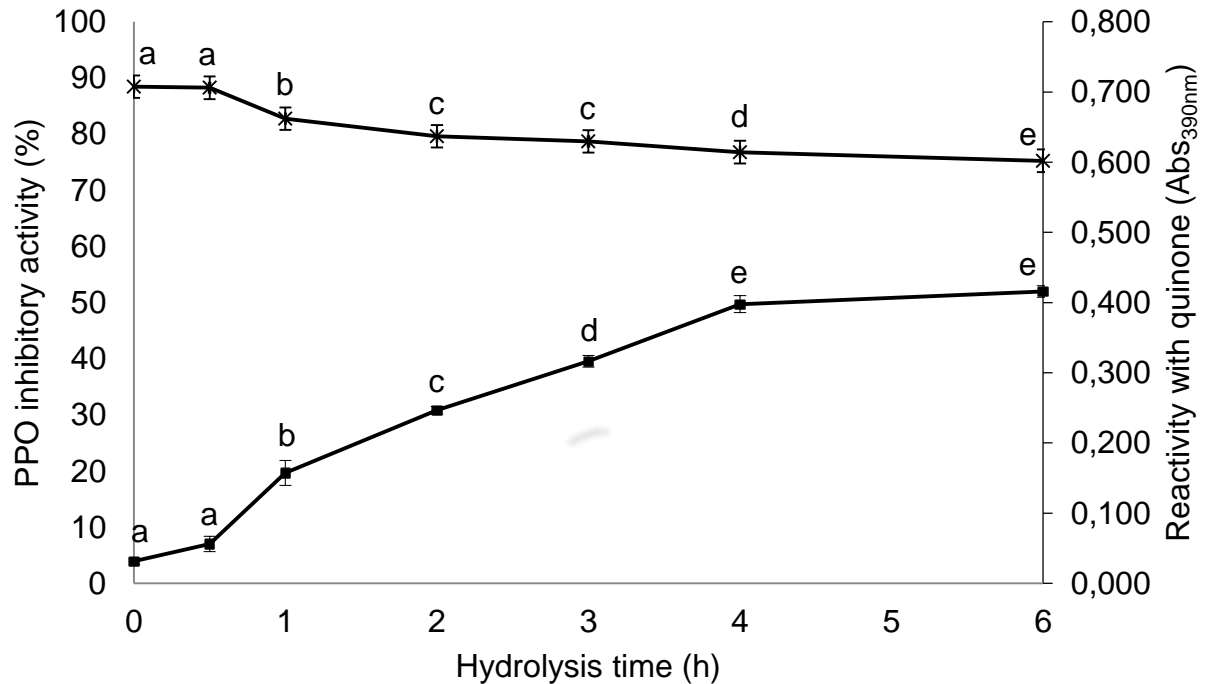


Figure 2. Quinone reactivity (x, Abs_{390nm}) and PPO inhibitory activity (■, %) by buffalo whey hydrolyzed by Alcalase. Values are the means ± standard deviations of three independent experiments. Data on the same line accompanied by different letters differ statistically from each other by the Tukey test ($P < 0.05$).

Histidine residues are present in peptides with high PPO inhibitory capacity, along with residues of phenylalanine, cysteine, tryptophan, tyrosine and arginine. The presence of phenylalanine residues (which are structurally similar to tyrosine, a PPO substrate) in the peptide chain would allow its accommodation and formation of a strong interaction with the active site of the enzyme, which would cause competitive inhibition (Nie et al 2017; Puangphet et al 2015; Wu et al 2008). Fragments of proteins (peptides) containing cysteine and/or phenylalanine residues along with apolar amino acid residues, such as valine, alanine, leucine, histidine and tryptophan, had their inhibitory power increased, since hydrophobicity would facilitate their entry and obstruction on the site of PPO, since

it is also apolar (Campas-Ríos et al 2012; Nie et al 2017; Noh et al 2009; Prakot et al 2015; Schurink et al 2007). Cysteine residues in these peptides probably follow a mechanism of action similar to that of sulfur compounds, such as sulfites and L-cysteine, which participate in the stabilization of *o*-quinones via nucleophilic addition or reduction reactions (Campas-Ríos et al 2012; Puangphet et al 2015; Eissa et al 2006). These conditions would allow the participation of these peptides as competitive inhibitors of PPO, acting in the enzymatic phase of the enzymatic browning of foods.

In addition to the function as competitive PPO inhibitors, peptides containing cysteine residues may act in the chemical phase of enzymatic browning, as well as sulfites and L-cysteine. In this phase, they stabilize *o*-quinones via nucleophilic addition or reduction reactions (Campas-Ríos et al 2012; Puangphet et al 2015; Eissa et al 2006).

As detailed in Figure 3, considering a nucleophilic addition mechanism, the thiol group of cysteine residues preferentially blocks the β carbons of each α , β -unsaturated carbonyl groups of the *o*-quinone (resulting from the action of the PPO), forming compounds of type 1,4-Michael (steps from V'' to IX). Unlike melanins, products resulting from the reactions between *o*-quinones and thiol groups are colorless (Ali et al 2015; Unnadkat 2011). It turns out that many of these reactive groups are internalized in the three-dimensional structure of the protein, which means that their properties are not always efficient for industrial application. The enzymatic hydrolysis of these proteins would bypass this situation by exposing the bioactive peptides to the medium, resulting in hydrolysates with higher reactivity with quinones (Castro and Sato 2015; Mohanty et al 2016; Cian et al 2012; Kadam et al 2015).

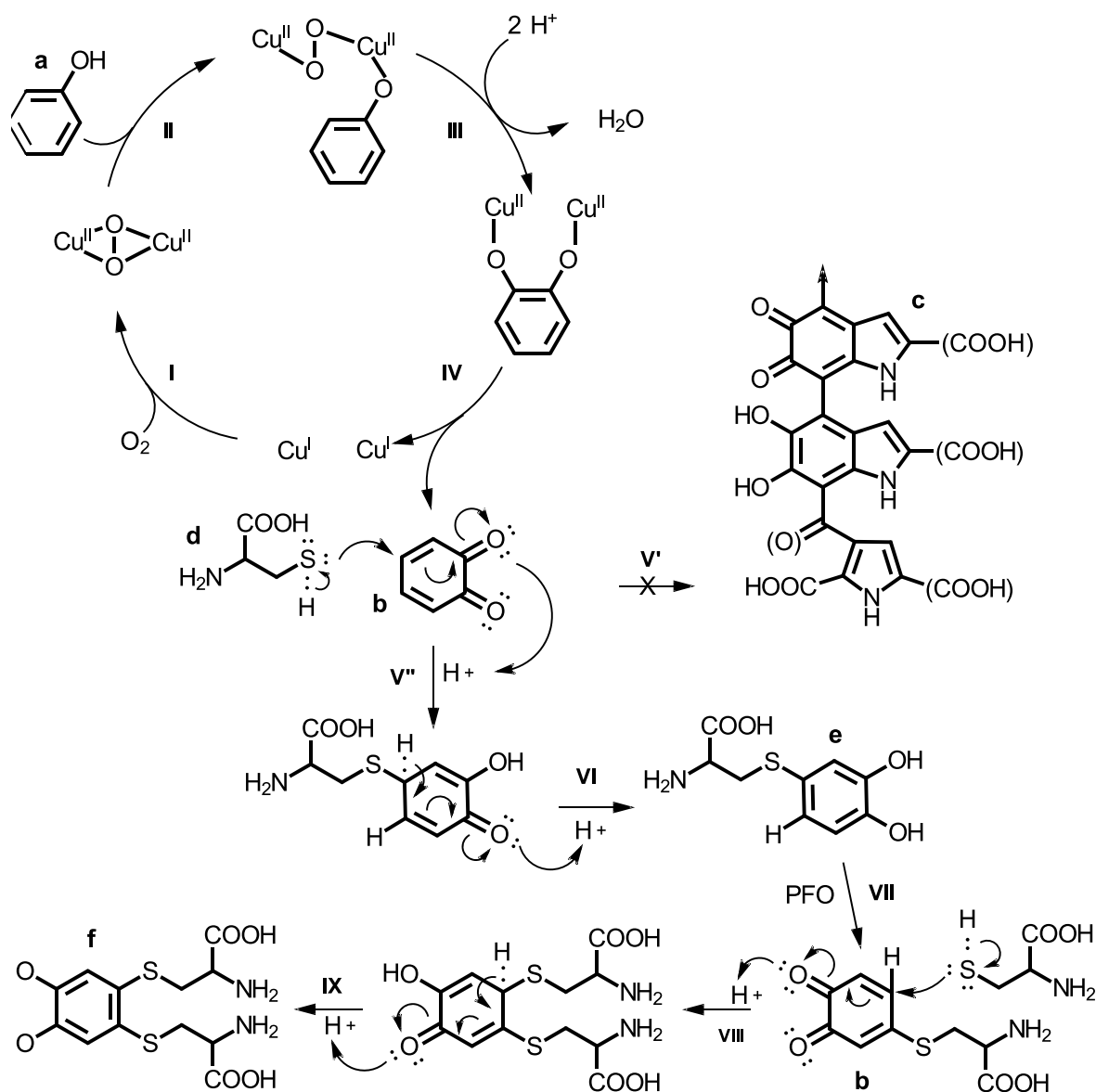


Figure 3. A possible mechanism for the enzymatic browning of foods (steps I to V'), highlighting two main phases: an enzymatic phase (steps I to IV), in which a monophenol (a), after binding to copper (Cu^{II}) of the active site of PPO, oxidizes to *o*-quinone (b); and a chemical phase (step V'), wherein the *o*-quinones spontaneously polymerize, forming melanins (c). The amino acid L-cysteine (d) acts as inhibitor of this modification (steps V'' to IX), blocking the chemical phase, via nucleophilic addition reaction of Michael 1,4, forming colorless thioecopes (e, f). Adapted by the authors from Ali et al (2015), Carletti et al (2014), Gamez et al (2001), Ging et al (2002) and Güray (2009).

From the results observed *in vitro*, the whey hydrolyzed by 4 h (t_{4h}) was selected to investigate the ability to inhibit enzymatic browning of minimally processed apples. After 6 days storage, it can be observed that apple samples treated with 4-h hydrolysate showed similar browning to those treated with metabisulfite (Figure 4). The values of parameters L^* and BI during the storage of apples treated with the 4-h hydrolysate and other inhibitors are presented in Tables 1 and 2, respectively. The value L^* measures the brightness on a scale ranging from black (0) to white (100), while the BI represents the purity of the brown color (Mohammadi et al 2008; Fazaeli et al 2013). They are important indicators for monitoring the enzymatic browning in foods since they present negative and positive correlation, respectively, with the concentration of melanins and with PPO activity (Ali et al 2015; Kumar et al 2013; Yun et al 2010). Enzyme inhibitory compounds are able to reduce the rate of melanin production so as to delay changes in these parameters or to keep them stable over the shelf life of the product (Ioannou and Ghoul 2013; Manolopoulou and Varzakas 2011; Sulaiman et al 2015).

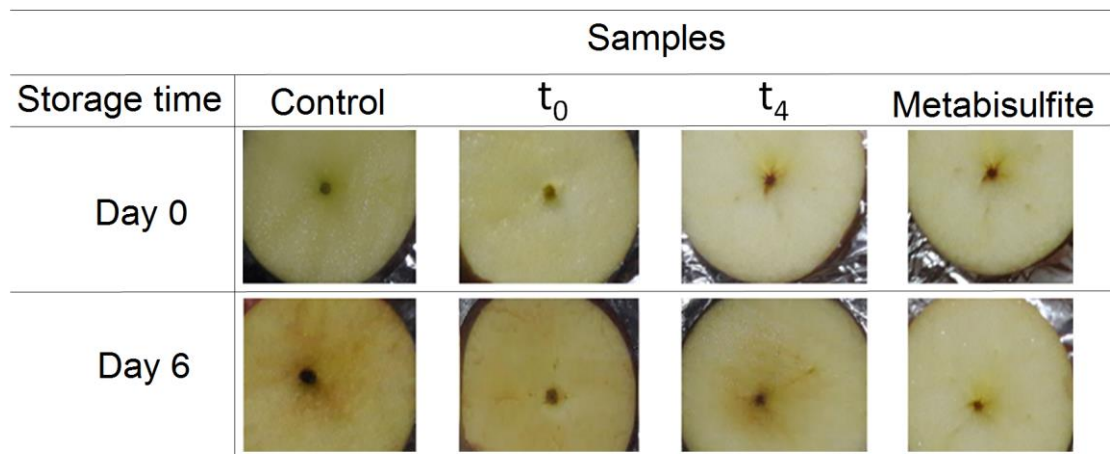


Figure 4. Enzymatic browning of minimally processed apples treated with different inhibitors and stored for up to 6 days. Control = treatment with phosphate buffer; t_0 = unhydrolyzed whey; t_4 = 4 h hydrolysate.

Table 1. Evolution of the L* parameter of minimally processed apples treated with different inhibitors of enzymatic browning and stored for up to 6 days. Values are the means \pm standard deviation of three different samples. Values followed by different letters differ statistically from each other by the Tukey test ($P < 0.05$); uppercase (comparison among inhibitors) and lowercase (comparison among storage time). t = storage time.

t	Inhibitors			
	Phosphate buffer (blank)	Unhydrolysed whey (t _{0h})	Hydrolysed whey (t _{4h})	Metabisulfite (control)
0 d	79.42 \pm 0.41 Aa	79.57 \pm 1.10 Aa	79.69 \pm 0.54 Aa	79.94 \pm 0.46 Aa
1 d	75.77 \pm 0.11 Ab	73.86 \pm 0.27 Ab	78.85 \pm 0.44 Bab	79.02 \pm 0.30 Ca
2 d	74.91 \pm 0.42 Abc	74.47 \pm 0.41 Ab	78.44 \pm 0.51 Bab	78.74 \pm 1.35 Ba
6 d	74.19 \pm 0.48 Ac	73.59 \pm 0.21 Ab	77.76 \pm 0.50 Bb	78.14 \pm 0.57 Ba

The hydrolysis process by Alcalase resulted in a significant increase in the efficiency of buffalo whey in the control of browning of apples (Tables 1 and 2). The 4-h hydrolysate maintained the L* value (Table 1), of the fruit samples during the 6 days of storage, not differing significantly ($P > 0.05$) from metabisulfite, one of the most efficient chemical agents and frequently used as enzymatic browning inhibitor in food (Altunkaya 2011; Schurink et al 2007; Sukhonthara and Theerakulkait 2012). The opposite was observed for apples treated with unhydrolyzed whey, where L* values changed in the first day of storage. Regarding the BI (Table 2), metabisulfite was more efficient than the other treatments, maintaining similar values during 6 days storage. Although the 4-h hydrolysate was less efficient to control browning than metabisulfite, it is important to note that it resulted lower BI values than unhydrolyzed whey. Considering this specific case, this hydrolysate could be used as a color stabilizer for minimally processed apples stored for up to 24 h. It could also be useful as a substitute for metabisulfites in the production of dehydrated apples, in which the interval between peeling and drying, generally less than 24 h, is determinant for PPO activity and product browning (Paunović et al 2010; Velickova et al 2014).

Table 2. Evolution of BI of minimally processed apples treated with different inhibitors of enzymatic browning and stored for up to 6 days. Values are the means \pm standard deviation of three different samples. Values followed by different letters differ statistically from each other by the Tukey test ($P > 0.05$); uppercase (comparison among inhibitors) and lowercase (comparison among storage time). t = storage time.

t	Inhibitors			
	Phosphate buffer (blank)	Unhydrolysed whey (t _{0h})	Hydrolyzed whey (t _{4h})	Metabisulfite (control)
0 d	27.20 \pm 1.04 Aa	25.63 \pm 1.15 Aa	25.55 \pm 1.52 Aa	24.39 \pm 2.38 Aa
1 d	35.42 \pm 1.07 Ab	35.47 \pm 1.06 Ab	31.55 \pm 0.66 Ba	27.13 \pm 1.81 Ca
2 d	41.24 \pm 0.91 Ac	41.39 \pm 2.84 Ac	35.41 \pm 1.72 Bb	27.84 \pm 0.22 Ca
6 d	42.86 \pm 0.52 Ac	46.36 \pm 0.47 Bd	37.39 \pm 0.38 Cc	26.08 \pm 0.96 Da

It is worth remembering that the instrumental analysis of color does not always faithfully reproduce or correlate with human visual perception (Batu et al 2014; Granato and Masson 2010). Thus, these findings can be considered as interesting preliminary information on the potential of hydrolysed buffalo whey as a natural stabilizing additive of the color quality of minimally processed apples.

Conclusions

The hydrolysis process resulted in a significant increase in the efficiency of buffalo whey in the control of browning of minimally processed apples. Specifically for the control of luminosity (L^* value), the hydrolyzate demonstrated similar performance to that of metabisulfite, one of the most efficient chemical used as an inhibitor of enzymatic browning in foods. However, this hydrolyzate was less efficient than the metabisulfite when evaluated for its ability to control the browning index (BI) of the fruits. Even so, it is worth noting that he kept it in the first 24 h, unlike the non-hydrolyzed whey. These results show possible applications of buffalo whey hydrolyzed with Alcalase as a natural substitute for additives conventionally used in the control of this type of browning in foods. We suggest further studies, such as the identification and isolation of these peptides and their evaluation of PPO behavior in food systems.

REFERENCES

- ABUBAKR, A.S.M. Antibrowning activity of bioactive peptides from lab-cultured skim milk hydrolysate. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 5, p. 212-228, 2016.
- ALI, H.M. et al. Browning inhibition mechanisms by cysteine, ascorbic acid and citric acid, and identifying PPO-catechol-cysteine reaction products. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, p. 3651-3659, 2015.
- AOAC INTERNATIONAL. **Official methods of analysis**. 16. ed., Gaithersburg: Published by AOAC International, 1997. 2v.
- ALTUNKAYA, A. Effect of whey protein concentrate on phenolic profile and browning of fresh-cut lettuce (*Lactuca sativa*). **Food Chemistry**, v. 128, p. 754-760, 2011.
- ATES, S.; PEKYARDUNCI, S.; COKMUS, S. Partial characterization of a peptide from honey that inhibits mushroom polyphenol oxidase. **Journal of Food Biochemistry**, v. 25, p. 127-137, 2001.
- BATU, A.; ARSLAN, A.; EROGLU, A. Effects of black grape syrup on texture, colour and sensory qualities of value added turkish delight (lokum). **Journal of Nutritional and Food Sciences**, v. S8, p. 2-8, 2014.
- CASTRO, R.J.S.; SATO, H.H. Biologically active peptides: Processes for their generation, purification and identification and applications as natural additives in the food and pharmaceutical industries. **Food Research International**, v. 74, p. 185-198, 2015.
- CIAN, R.E.; MARTÍNEZ-AUGUSTIN, O.; DRAGO, S.R. Bioactive properties of peptides obtained by enzymatic hydrolysis from protein byproducts of *Porphyra columbina*. **Food Research International**, v. 49, p. 364-372, 2012.
- BAL, L. M. et al. Kinetics of colour change of bamboo shoot slices during microwave drying. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 46, p. 827-833, 2011.
- CAMPAS-RÍOS, M.J. et al. Hydrolysates from wheat bran albumin as color-adding agents and inhibitors of apple polyphenol oxidase. **Journal of Food Biochemistry**, v. 36, n. 4, p. 470-478, 2012.
- CHANG, C.-Y.; WU, K.-C.; CHIANG, S.-H. Antioxidant properties and protein compositions of porcine haemoglobin hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 100, p. 1537-1543, 2007.
- DUH, P.D.; TU, Y.Y.; YEN, G. C. Antioxidant activity of water extract of Harng Jyur (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). **LWT - Food Science and Technology**, v. 32. p. 269-277, 1999.

ESTATCAMP. **Action Stat versão 3.1.43.706.675**. São Carlos: Estatcamp, 2016. Disponível em: < <http://www.portalaction.com.br/content/download-action>>

IOANNOU, I.; GHOU, M. Prevention of enzymatic browning in fruit and vegetables. **European Scientific Journal**, v. 9, n. 30, p. 310-341, 2013.

EISSA, H.A. et al. Thiol containing compounds as controlling agents of enzymatic browning in some apple products. **Food Research International**, v. 39, n. 8, p. 855-863, 2006.

FAZAEI, M.; HOJJATPANAH, G.; EMAM-DJOMEH, Z. Effects of heating method and conditions on the evaporation rate and quality attributes of black mulberry (*Morus nigra*) juice concentrate. **Journal of Food Science and Technology**, v. 50, n. 1, p. 35-43, 2013.

GALLEGOS-TINTORÉ, S. et al. Antioxidant and chelating activity of *Jatropha curcas* L. protein hydrolysates. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 9, p. 1618-1624, 2011.

GONÇALVES, A. A.; OLIVEIRA, A. R. M. Melanosis in crustaceans: A review. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 791-799, 2016.

GRANATO, D.; MASSON, M. L. Instrumental color and sensory acceptance of soy-based emulsions: a response surface approach. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 4, p. 1090-1096, 2010.

GUZMÁN-MÉNDEZ, B. et al. Comparison of physicochemical properties, antioxidant and metal-chelating activities of protein hydrolysates from *Phaseolus lunatus* and hard-to-cook *Phaseolus vulgaris*. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 49, n. 8, p. 1859–1868, 2014.

HOYLE, N.T.; MERRIT, J. H. Quality of fish protein hydrolysate from Herring (*Clupea harengus*). **Journal of Food Science**, v. 59, p. 76-79, 1994.

KADAM, S. U. et al. Ultrasound for the extraction, identification and delivery of food proteins and bioactive peptides. **Trends in Food Science & Technology**, v. 46, n. 1, p. 60–67, 2015.

KUMAR, D. et al. Pericarp browning and quality management of litchi fruit by antioxidants and salicylic acid during ambient storage. **Journal of Food Science and Technology**, v. 50, n. 4, p. 797–802, 2013.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 267-275, 1951.

NAKCHUM, L.; KIM, S. M. Preparation of squid skin collagen hydrolysate as an antihyaluronidase, antityrosinase, and antioxidant agent. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 46, n. 2 p. 123-130, 2016.

MANOLOPOULOU, E.; VARZAKAS, T. Effect of storage conditions on the sensory quality, colour and texture of fresh-cut minimally processed cabbage with the addition of ascorbic acid, citric acid and calcium chloride. **Food and Nutrition Sciences**, v. 2, p. 956-963, 2011.

MEGÍAS, C. et al. 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, 2008.

MOHAMMADI, A. et al. Kinetic models for colour changes in kiwifruit slices during hot air drying. **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 4, n. 3, p. 376-383, 2008.

MOHANTY, D. P. et al. Milk derived bioactive peptides and their impact on human health – A review. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 23, n. 5, p. 577–583, 2016.

NIE, H. et al. A novel heptapeptide with tyrosinase inhibitory activity identified from a phage display library. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 181, n. 1, p. 219-232, 2017.

NIRMAL, N. P.; BENJAKUL, S. Inhibition of melanosis formation in pacific white shrimp by the extract of lead (*Leucaena leucocephala*) seed. **Food Chemistry**, v. 128, p. 427–432, 2011.

NOH, J. M. et al. Kojic acid–amino acid conjugates as tyrosinase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, p. 5586–5589, 2008.

OCHIAI, A. et al. Rice bran protein as a potent source of antimelanogenic peptides with tyrosinase inhibitory activity. **Journal of Natural Products**, v. 79, p. 2545–2551, 2016.

PAUNOVIĆ, D. M.; ZLATKOVIĆ, B. P.; MIRKOVIĆ D. D. kinetics of drying and quality of the apple cultivars Granny Smith, Idared and Jonagold. **Journal of Agricultural Sciences**, v. 55, n. 3, p. 261-272, 2010.

PÉREZ-GAGO, M. B.; SERRA, M.; DEL RÍO, M. A. Color change of fresh-cut apples coated with whey protein concentrate-based edible coatings. **Postharvest Biology and Technology**, v. 39, n. 1, p. 84–92, 2006.

PRAKOT, P.; CHAITANAWISUTI, N.; KARNCHANATAT, A. In vitro anti-tyrosinase activity of protein hydrolysate from spotted babylon (*Babylonia areolata*). **Food and Applied Bioscience Journal**, v. 3, n. 2, p. 109–120, 2015.

PUANGPHET, A.; TIYABOONCHAI, W.; THONGSOOK, T. Inhibitory effect of sericin hydrolysate on polyphenol oxidase and browning of fresh-cut products. **International Food Research Journal**, v. 22, n. 4, p. 1623-1630, 2015.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 1231–1237, 1999.

SCHURINK, M. et al. Novel peptides with tyrosinase inhibitory activity. **Peptides**, v. 28, p. 485–495, 2007.

SUKHONTHARA, S.; THEERAKULKAIT, C. Inhibitory effect of rice bran extract on polyphenol oxidase of potato and banana. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, p. 482–487, 2012.

SULAIMAN, A. et al. Thermosonication for polyphenoloxidase inactivation in fruits: modeling the ultrasound and thermal kinetics in pear, apple and strawberry purees at different temperatures. **Journal of Food Engineering**, v. 165, p. 133-140, 2015.

UNNADKAT, N. R. **Effect of thiol-quinone reactions on polyphenol and lipid instability in foods**. 2011. 171f. Thesis (Master of Science in Food Science). Department of Food Science, The Pennsylvania State University, 2011. Disponível em: <<https://etda.libraries.psu.edu/catalog/12002>>. Acesso em 24 de mar. de 2017.

VELICKOVA, E.; WINKELHAUSEN, E.; KUZMANOVA, S. Physical and sensory properties of ready to eat apple chips produced by osmo-convective drying. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 12, p. 3691-3701, 2014.

WANG, J.-S. et al. Characterization of hydrolysates derived from enzymatic hydrolysis of wheat gluten. **JFS C: Food Chemistry and Toxicology**, v. 72, n. 2, p. C103-C107, 2007.

WEEMAES, C. A. et al. Influence of pH, benzoic acid, EDTA, and glutathione on the pressure and/or temperature inactivation kinetics of mushroom polyphenoloxidase. **Biotechnology Progress**, v. 13, p. 25–32, 1997.

WU, J.-H.; WANG, W.; XU, S.-Y. Enzymatic production of bioactive peptides from sericin recovered from silk industry wastewater. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 480–487, 2008.

YI, J.; DING, Y. Dual effects of whey protein isolates on the inhibition of enzymatic browning and clarification of apple juice. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 32, n. 6, p. 601–609, 2014.

YUN, I. S. et al. Skin color analysis using a spectrophotometer in Asians. **Skin Research and Technology**, v. 16, n. 3, p. 311-315, 2010.

4 CONCLUSÕES

Hidrolisados proteicos têm demonstrado maior poder de inibição do escurecimento enzimático de alimentos, comparativamente às respectivas proteínas no estado nativo. Nesse contexto, a influência da hidrólise do soro de leite bubalino com Alcalase, até então não abordada na literatura científica, foi o objetivo deste trabalho. O processo de hidrólise foi acompanhado por determinação do grau de hidrólise (GH). Para se entender possíveis modos de ação sobre o escurecimento enzimático, o soro, ao longo do tempo de hidrólise, foi submetido às análises de capacidade antioxidante (capacidade de sequestro do radical ABTS^{•+}, atividade quelante de Fe²⁺ e poder redutor), reatividade com quinonas e atividade inibitória sobre polifenoloxidasas (PFO) extraídas de maçãs *Red Delicious*. Essa relação sugere que a hidrólise conduziu à liberação de peptídeos específicos com atividade biológica a partir das proteínas do soro de leite, prováveis responsáveis pelo aumento significativamente dessas propriedades ao longo de todo o processo. Quando avaliada a capacidade de inibição do escurecimento de maçãs minimamente processadas, o soro de leite bubalino hidrolisado com Alcalase por 4 h manteve a luminosidade dos frutos durante 6 dias de armazenamento. Essa eficiência não diferiu estatisticamente ($p > 0,05$) da eficiência do metabissulfito, um dos agentes químicos mais eficientes e frequentemente utilizados como inibidor do escurecimento enzimático em alimentos. O contrário foi observado para as maçãs tratadas com o soro de leite não hidrolisado, que sofreram alteração nesse parâmetro logo no primeiro dia de armazenamento. No controle do índice de escurecimento das maçãs, o soro de leite hidrolisado também se destacou melhor que o não hidrolisado. Esses resultados evidenciam possíveis aplicações do soro de leite bubalino hidrolisado com Alcalase como substituto natural de aditivos convencionalmente utilizados na inibição desse tipo de escurecimento em alimentos.

5 PERSPECTIVAS

Os dados obtidos neste trabalho chamam atenção para o desenvolvimento de aprofundadas pesquisas quanto ao uso do soro de leite bubalino hidrolisado como inibidor de polifenolxidasas (PFO) e do escurecimento enzimático de alimentos, sugerindo-se a seguinte temática:

- Capacidade de inibição de PFO e do escurecimento enzimático em alimentos pelo soro de leite hidrolisado obtido sob diferentes variáveis (como enzima, soro de diferentes espécies, tempo, temperatura e pH);
- Estudo da capacidade de inibição do escurecimento enzimático em diversos alimentos (incluindo outras frutas, hortaliças, camarões e cogumelos comestíveis) pelo soro leite bubalino hidrolisado;
- Aceitabilidade de alimentos tratados com soro de leite hidrolisado (esse assunto raramente discutido na literatura);
- Purificação, identificação e elucidação de mecanismos de ação dos prováveis peptídeos responsáveis pela atividade inibitória de PFO e do escurecimento enzimático em alimentos;
- Vale ressaltar que as PFO também apresentam grande importância nas áreas médica, farmacêutica e química. Por exemplo, na área médica, a atividade dessas enzimas está associada a algumas doenças da pele, como melanoma e hiperpigmentação. Novos peptídeos têm sido estudados para se controlar essas patologias. Sendo assim, sugere-se que o foco de pesquisas futuras abordando o soro de leite hidrolisado como inibidor de PFO deve ultrapassar as fronteiras da Ciência e Tecnologia de Alimentos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUBAKR, A. S. M. Antibrowning activity of bioactive peptides from lab-cultured skim milk hydrolysate. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 5, n. 10, p. 212-228, 2016.

AHMED, A. S. et al. Identification of potent antioxidant bioactive peptides from goat milk proteins. **Food Research International**, v. 74, p. 80–88, 2015.

ALI, H.M. et al. Browning inhibition mechanisms by cysteine, ascorbic acid and citric acid, and identifying PPO-catechol-cysteine reaction products. **Journal of Food Science & Technology**, v. 52, n. 6, p. 3651–3659, 2015.

ALMEIDA-PAES, R. et al. Melanin biosynthesis in pathogenic species of *Sporothrix*. **Fungal Biology Reviews**, v. 31, p. 50-59, 2017.

ALTUNKAYA, A. Effect of whey protein concentrate on phenolic profile and browning of fresh-cut lettuce (*Lactuca Sativa*). **Food Chemistry**, v. 128, p. 754–760, 2011.

AOAC INTERNATIONAL. **Official methods of analysis**. 16. ed., Gaithersburg: Published by AOAC International, 1997. 2v.

AQUARONE, E. et al. **Biotecnologia Industrial: Biotecnologia na Produção de Alimentos**. 1. ed. São Paulo: Ed. Edgard Blücher Ltda., 2001. v. 4.

ATES, S.; PEKYARDIMCI, S.; COKMUS, S. Partial characterization of a peptide from honey that inhibits mushroom polyphenol oxidase. **Journal of Food Biochemistry**, v. 25, p. 127-137, 2001.

BAH, C. S. F. et al. Production of bioactive peptide hydrolysates from deer, sheep and pig plasma using plant and fungal protease preparations. **Food Chemistry**, v. 176, p. 54–63, 2015.

BORGHESE, A. Buffalo livestock and products in Europe. **Buffalo Bulletin**, v. 32, p. 50-74, 2013.

BORGHESE, A.; TERZANO, G. M.; MAZZI, M. Buffalo breeding development in Italy. In: Seminar dan Lokakarya Nasional Kerbau, 2011, Samarinda. **Anais...Bogor: Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan**, 2012. Disponível em: <http://peternakan.litbang.pertanian.go.id/index.php?option=com_content&view=category&id=361&Itemid=122>. Acesso em 15 ago. 2015.

BRANDELLI, A.; DAROIT, D.J.; CORRÊA, A.P. Whey as a source of peptides with remarkable biological activities. **Food Research International**, v. 73, p. 149–161, 2015.

- CACCIÒ , S. M. et al. Molecular identification of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* in the Italian water buffalo (*Bubalus bubalis*). **Veterinary Parasitology**, v. 150, p. 146–149, 2007.
- CAI, L. et al. Purification and characterization of three antioxidant peptides from protein hydrolysate of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin. **Journal of Functional Foods**, v. 16, p. 234–242, 2015.
- CALABRÒ, S. et al. Meat quality of buffalo young bulls fed faba bean as protein source. **Meat Science**, v. 96, p. 591-596, 2014.
- CAMPAS-RÍOS, M. J. et al. Hydrolysates from wheat bran albumin as color-adding agents and inhibitors of apple polyphenol oxidase. **Journal of Food Biochemistry**, v. 36, n. 4, p. 470–478, 2012.
- CARLETTI, G.; NERVO, G.; CATTIVELLI, L. Flavonoids and Melanins: A Common Strategy across Two Kingdoms. **International Journal of Biological Sciences**, v. 10, n. 10, p. 1159-1170, 2014.
- CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Biologically active peptides: Processes for their generation, purification and identification and applications as natural additives in the food and pharmaceutical industries. **Food Research International**, v. 74, p. 185-198, 2015.
- CHANG, T.-S. An Updated Review of Tyrosinase Inhibitors. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, p. 2440-2475, 2009.
- CLAEYS, W. L. et al. Consumption of raw or heated milk from different species: An evaluation of the nutritional and potential health benefits. **Food Control**, v. 42, p. 188-201, 2014.
- CORRÊA, A. P. F. et al. Hydrolysates of sheep cheese whey as a source of bioactive peptides with antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory activities. **Peptides**, v. 61, p. 48–55, 2014.
- CZERWENKA, C.; MÜLLER, L.; LINDNER, W. Detection of the adulteration of water buffalo milk and mozzarella with cow's milk by liquid chromatography–mass spectrometry analysis of β -lactoglobulin variants. **Food Chemistry**, v. 122, p. 901–908, 2010.
- DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, O.R. **Química de Alimentos de Fennema**. Traduzido por Adriano Brandelli et al. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- DANILEWICZ, J. C. Interaction of sulfur dioxide, polyphenols, and oxygen in a wine-model system: central role of iron and copper. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 58, n. 1, p. 53-60, 2007.

DANILEWICZ, J. C. Mechanism of autoxidation of polyphenols and participation of sulfite in wine: key role of iron. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 62, n. 3, p. 319-328, 2011.

DANILEWICZ, J. C.; WALLBRIDGE, P. J. Further studies on the mechanism of interaction of polyphenols, oxygen, and sulfite in wine. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 61, n. 2, p. 166-175, 2010.

DE SIMONE, C. et al. Characterisation and cytomodulatory properties of peptides from Mozzarella di Bufala Campana cheese whey. **Journal of Peptide Science**, v. 15, p. 251–258, 2009.

DIXIT, S. J.; KK, A. K.; SINGH, K. Study of human allergic milk whey protein from different mammalian species using computational method. **Bioinformatics**, v. 8, n. 21, p. 1035–1041, 2012.

EL-SALAM, M. H. A.; EL-SHIBINY, S. A comprehensive review on the composition and properties of buffalo milk. **Dairy Science & Technology**, v. 91, n. 6, p. 663-699, 2011.

EL-SALAM, M. H. A.; EL-SHIBINY, S. Bioactive peptides of buffalo, camel, goat, sheep, mare, and yak milks and milk products. **Food Reviews International**, v. 29, n. 1, p. 1-23, 2013.

FAOSTAT. STATISTICS DIVISION, FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Disponível em: < <http://faostat3.fao.org/compare/S/>>. Acesso em 16 de ago. de 2015.

FRONK, P. et al. Polyphenoloxidase from Riesling and Dornfelder wine grapes (*Vitis vinifera*) is a tyrosinase. **Food Chemistry**, v. 183, p. 49–57, 2015.

GAMEZ, P. et al. Homogeneous bio-inspired copper-catalyzed oxidation reactions. **Chemical Society Reviews**, v. 30, p. 376–385, 2001.

GARCÍA-FLORES, R. et al. A novel facility and equipment selection model for whey utilisation: A Brazilian case study. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 117, p. 127–140, 2015.

GARCIA-JIMENEZ, A. et al. Characterization of the action of tyrosinase on resorcinols. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 24, p. 4434–4443, 2016.

GALLEGOS-TINTORÉ, S. et al. Antioxidant and chelating activity of *Jatropha curcas* L. protein hydrolysates. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 9, p. 1618–1624, 2011.

GING, C.-K. et al. Inhibition of loquat enzymatic browning by sulfhydryl compounds. **Food Chemistry**, v. 76, p. 213–218, 2002.

GONÇALVES, A. A.; OLIVEIRA, A. R. M. Melanosis in crustaceans: A review. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 791-799, 2016.

GÜRAY, M. Z. **Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from thermophilic *Bacillus* sp.** 2009. 54f. Thesis (Master of Science in Biotechnology). Graduate School of Engineering and Sciences, İzmir Institute of Technology, Izmir, 2009. Disponível em: <<http://openaccess.iyte.edu.tr/handle/11147/3023>>. Acesso em 24 de mar. de 2017.

GUZMÁN-MÉNDEZ, B. et al. Comparison of physicochemical properties, antioxidant and metal-chelating activities of protein hydrolysates from *Phaseolus lunatus* and hard-to-cook *Phaseolus vulgaris*. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 49, n. 8, p. 1859–1868, 2014.

HAMANN, J. N. et al. Small-molecule models of tyrosinase: from ligand hydroxylation to catalytic monooxygenation of external substrates. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 334, p. 54–66, 2017.

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B. et al. Identification of antioxidant and ACE inhibitory peptides in fermented milk. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, n. 6, p. 1041–1048, 2005.

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; RAMOS, M.; GÓMEZ-RUIZ, J. A. Bioactive components of ovine and caprine cheese whey. **Small Ruminant Research**, v. 101, p. 196–204, 2011.

IOANNOU, I.; GHOUL, M. Prevention of enzymatic browning in fruit and vegetables. **European Scientific Journal**, v. 9, n. 30, p. 310-341, 2013.

ITO, K. et al. Melanin pigmentation gives rise to black spots on the wings of the silkworm *Bombyx mori*. **Journal of Insect Physiology**, v. 91-92, p. 100–106, 2016.

KHEMAKHEM, M. et al. Melanin and humic acid-like polymer complex from olive mill waste waters. Part I. **Isolation and characterization**. *Food Chemistry*, v. 203, p. 540–547, 2016.

LIU, F. et al. Purification and structural analysis of membrane-bound polyphenol oxidase from Fuji apple. **Food Chemistry**, v. 183, p. 72–77, 2015.

MA, Y. et al. Reassessment of treatments to retard browning of fresh-cut Russet potato with emphasis on controlled atmospheres and low concentrations of bisulphite. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 45, p. 1486–1494, 2010.

MACIEL, A. C. D.; WASZCZYNSKYJ, N. Obtenção de lactose do soro de queijo tipo mussarela. **Boletim CEPPA**, v. 16, p. 203-216, 1998.

MAIA, G. A.; LIMA, A. S.; FREITAS, C. A. S. Aplicações do dióxido de enxofre na manutenção da qualidade de sucos de frutas tropicais. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 65, n. 1, p. 1-6, 2006.

MALLICK, M. et al. Homology modelling of polyphenol oxidase from solanum melongena: sequence analysis and structural validation studies – *In Silico*. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 2, n. 3, p. B-319-B-328, 2011.

MANOLOPOULOU, E.; VARZAKAS, T. Effect of storage conditions on the sensory quality, colour and texture of fresh-cut minimally processed cabbage with the addition of ascorbic acid, citric acid and calcium chloride. **Food and Nutrition Sciences**, v. 2, p. 956-963, 2011.

MEGÍAS, C. et al. 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, 2008.

MENDIS, E. et al. Investigation of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin gelatin peptides for their in vitro antioxidant effects. **Life Sciences**, v. 77, p. 2166–2178, 2005.

MIRABELLA, N.; CASTELLANI, V.; SALA, S. Current options for the valorization of food manufacturing waste: a review. **Journal of Cleaner Production**, v. 65, p. 28-41, 2014.

MOHAMMADI, A. et al. Kinetic models for colour changes in kiwifruit slices during hot air drying. **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 4, n. 3, p. 376-383, 2008.

MOHANTY, D. P. et al. Milk derived bioactive peptides and their impact on human health – A review. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 23, n. 5, p. 577–583, 2016.

MORA, L. et al. Proteomic identification of antioxidant peptides from 400 to 2500 Da generated in Spanish dry-cured ham contained in a size-exclusion chromatography fraction. **Food Research International**, v. 56, p. 68–76, 2014.

NAJAFIAN, L.; BABJI, A. S. Production of bioactive peptides using enzymatic hydrolysis and identification antioxidative peptides from patin (*Pangasius sutchi*) sarcoplasmic protein hydrolysate. **Journal of Functional Foods**, v. 9, p. 280–289, 2014.

NAKCHUM, L.; KIM, S. M. Preparation of squid skin collagen hydrolysate as an antihyaluronidase, antityrosinase, and antioxidant agent. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 46, n. 2 p. 123-130, 2016.

NAQASH, S. Y.; NAZEER, R. A. Evaluation of bioactive properties of peptide isolated from *Exocoetus volitans* backbone. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 46, p. 37–43, 2011.

NAWAZ, M.; MASUD, T.; SAMMI, S. Quality evaluation of mozzarella cheese made from buffalo milk by using paneer booti (*Withania coagulans*) and calf rennet. **International Journal of Dairy Technology**, v. 64, n. 2, p. 218-226, 2011.

NAZEER, R. A. et al. Radical scavenging activity of Seela (*Sphyaena barracuda*) and Ribbon Fish (*Lepturacanthus savala*) Backbone Protein Hydrolysates. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 17, p. 209–216, 2011.

NIE, H. et al. A novel heptapeptide with tyrosinase inhibitory activity identified from a phage display library. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 181, n. 1, p. 219-232, 2017.

NIRMAL, N. P.; BENJAKUL, S. Inhibition of melanosis formation in pacific white shrimp by the extract of lead (*Leucaena leucocephala*) seed. **Food Chemistry**, v. 128, p. 427–432, 2011.

NOH, J. M. et al. Kojic acid–amino acid conjugates as tyrosinase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, p. 5586–5589, 2008.

OCHIAI, A. et al. Rice bran protein as a potent source of antimelanogenic peptides with tyrosinase inhibitory activity. **Journal of Natural Products**, v. 79, p. 2545–2551, 2016.

OLIVEIRA, C. M. et al. Oxidation mechanisms occurring in wines. **Food Research International**, v. 44, p. 1115–1126, 2011.

PÉREZ-GAGO, M. B.; SERRA, M.; DEL RÍO, M. A. Color change of fresh-cut apples coated with whey protein concentrate-based edible coatings. **Postharvest Biology and Technology**, v. 39, n. 1, p. 84–92, 2006.

PRAKOT, P.; CHAITANAWISUTI, N.; KARNCHANATAT, A. In vitro anti-tyrosinase activity of protein hydrolysate from spotted babylon (*Babylonia areolata*). **Food and Applied Bioscience Journal**, v. 3, n. 2, p. 109–120, 2015.

PUANGPHET, A.; TIYABOONCHAI, W.; THONGSOOK, T. Inhibitory effect of sericin hydrolysate on polyphenol oxidase and browning of fresh-cut products. **International Food Research Journal**, v. 22, n. 4, p. 1623-1630, 2015.

RATHI, M.; UPADHYAY, N.; DABUR, R. S.; GOYAL, A. Formulation and physico-chemical analysis of whey-soymilk dahi. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 2, p. 968-975, 2015.

REBOUILLAT, S.; ORTEGA-REQUENA, S. potential applications of milk fractions and valorization of dairy by-products...**Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, v. 6, p. 176-203, 2015.

REKTOR, A.; VATAI, G. Membrane filtration of Mozzarella whey. **Desalination**, v. 162, p. 279-286, 2004.

RIZZELLO, C. G. et al. Antibacterial activities of peptides from the water-soluble extracts of Italian cheese varieties. **Journal of Dairy Science**, v. 88:, p. 348–2360, 2005.

SANTOS, I. R. C. **Escurecimento enzimático em frutos: polifenoloxidase de atemóia (*Annona cherimola* Mill. X *Annona squamosa* L.)**. 2009. 120f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", FCFAR/UNESP, Araraquara, 2009. Disponível em: <<http://www2.fcfar.unesp.br/Home/Pos-graduacao/AlimentoseNutricao/IzabellaChavesME.pdf>>. Acesso em 03 de abr. de 2017.

SARNA, M. et al. The nanomechanical role of melanin granules in the retinal pigment epithelium. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 13, n. 3, p. 801 – 807, 2017.

SCHURINK, M. et al. Novel peptides with tyrosinase inhibitory activity. **Peptides**, v. 28, p. 485–495, 2007.

SCOTT, R. **Fabricación de Quesos**. Zaragoza: Editorial Acribia. S.A, 1991. 520p.

SCRIMGEOUR, N. et al. Exploring the effect of elevated storage temperature on wine composition. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 21, p. 713–722, 2015.

SHERIFF, S. A. et al. Synthesis and in vitro antioxidant functions of protein hydrolysate from backbones of *Rastrelliger kanagurta* by proteolytic enzymes. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 21, p. 19–26, 2014.

SILVA, L. F. et al. Diversity of lactic acid bacteria isolated from Brazilian water buffalo mozzarella cheese. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 2, p. M411-M417, 2015.

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

SUKHONTHARA, S.; THEERAKULKAIT, C. Inhibitory effect of rice bran extract on polyphenol oxidase of potato and banana. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, p. 482–487, 2012.

SULAIMAN, A. et al. Thermosonication for polyphenoloxidase inactivation in fruits: modeling the ultrasound and thermal kinetics in pear, apple and strawberry purees at different temperatures. **Journal of Food Engineering**, v. 165, p. 133-140, 2015.

SUN, S. et al. Production of natural edible melanin by *Auricularia auricula* and its physicochemical properties. **Food Chemistry**, v.196, p. 486–492, 2016.

TEIXEIRA, L. V.; FONSECA, L. M. Perfil físico-químico do soro de queijos mozzarella e minas-padrão produzidos em várias regiões do estado de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.1, p.243-250, 2008.

TENORE, G. C. et al. Antioxidant peptides from “Mozzarella di Bufala Campana DOP” after simulated gastrointestinal digestion: In vitro intestinal protection, bioavailability, and anti-haemolytic capacity. **Journal of Functional Foods**, v. 15, p. 365–375, 2015.

TOIVONEN, P. M. A.; BRUMMELL, D. A. Biochemical bases of appearance and texture changes in fresh-cut fruit and vegetables. **Postharvest Biology and Technology**, v. 48, 1–14, 2008.

TÜRKE, A. et al. Electrochemistry of sulfur dioxide, polyphenols and ascorbic acid at poly(3,4-ethylenedioxythiophene) modified electrodes. **Electrochimica Acta**, v. 60, p. 184–192, 2012.

UNNADKAT, N. R. **Effect of thiol-quinone reactions on polyphenol and lipid instability in foods**. 2011. 171f. Thesis (Master of Science in Food Science). Department of Food Science, The Pennsylvania State University, 2011. Disponível em: <<https://etda.libraries.psu.edu/catalog/12002>>. Acesso em 24 de mar. de 2017.

VIEIRA, A. H. **Elaboração e estabilidade de queijo Minas frescal de leite de búfala concentrado por ultrafiltração com reduzido teor de sódio**. 2014. 75f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados). Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2014. Disponível em: <<http://www.ufjf.br/mestradoleite/dissertacoes/2014-2/>>. Acesso em 18 de ago. de 2015.

VILLARAMA, C. D.; MAIBACH, H. I. Glutathione as a depigmenting agent: an overview. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 27, p. 147–153, 2005.

VIRADOR, V. M. et al. Cloning, Sequencing, Purification, and Crystal Structure of Grenache (*Vitis vinifera*) Polyphenol Oxidase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 2, p. 1189–1201, 2010.

VOLLHARDT, K. P. C.; SCHORE, N. E. **Organic Chemistry: structure and function**. 6. ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2009.

WANG, J.-S. et al. Characterization of hydrolysates derived from enzymatic hydrolysis of wheat gluten. **JFS C: Food Chemistry and Toxicology**, v. 72, n. 2, p. C103-C107, 2007.

WANG, B. et al. Preparation and evaluation of antioxidant peptides from ethanol-soluble proteins hydrolysate of *Sphyrna lewini* muscle. **Peptides**, v. 36, n. 2, p. 240–250, 2012.

WANG, B. et al. Purification and characterisation of a novel antioxidant peptide derived from blue mussel (*Mytilus edulis*) protein hydrolysate. **Food Chemistry**, v. 138, p. 1713–1719, 2013.

WEEMAES, C. A. et al. Influence of pH, benzoic acid, EDTA, and glutathione on the pressure and/or temperature inactivation kinetics of mushroom polyphenoloxidase. **Biotechnology Progress**, v. 13, p. 25–32, 1997.

WEDZICHA, B. L. Sulphur dioxide in foods: chemical interactions. **Nutrition Bulletin**, v. 9, p. 155–164, 1984.

WU, J.-H.; WANG, W.; XU, S.-Y. Enzymatic production of bioactive peptides from sericin recovered from silk industry wastewater. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 480–487, 2008.

YADAV, J. S. S. et al. Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 6, pt.1, p. 756-74, 2015.

YAZICI, F.; AKBULUT, C. Impact of whey pH at drainage on the physicochemical, sensory, and functional properties of mozzarella cheese made from buffalo milk. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 9993–10000, 2007.

YI, J. et al. Effect of high-hydrostatic-pressure on molecular microstructure of mushroom (*Agaricusbisporus*) polyphenoloxidase. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, p. 890-898, 2015.

YI, J.; DING, Y. Dual effects of whey protein isolates on the inhibition of enzymatic browning and clarification of apple juice. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 32, n. 6, p. 601–609, 2014.

YUN, I. S. et al. Skin color analysis using a spectrophotometer in Asians. **Skin Research and Technology**, v. 16, n. 3, p. 311-315, 2010.

ZAVA, M. Developments of buffalo industry in America. **Buffalo Bulletin**, v. 32, p. 75-82, 2013.

ZHOU, C. et al. Antioxidant peptides from corn gluten meal: Orthogonal design evaluation. **Food Chemistry**, v. 187, p. 270–278, 2015.

ZHOU, L. et al. Different modes of inhibition for organic acids on polyphenoloxidase. **Food Chemistry**, v. 199, p. 439–446, 2016.

ZHU, H.; HE, C.-C.; CHU, Q.-H. Inhibition of quorum sensing in *Chromobacterium violaceum* by pigments extracted from *Auricularia auricular*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 52, n. 3, p. 269-274, 2011.

ANEXO – Comprovante de submissão, para publicação, do artigo intitulado “Buffalo cheese whey hydrolyzed with alcalase as an antibrowning agent in minimally processed apple” junto ao corpo editorial do Journal of Food Science and Technology

05/07/2017

Gmail - Journal of Food Science and Technology - Submission Notification to co-author



Dilson Silva <dilson13@gmail.com>

Journal of Food Science and Technology - Submission Notification to co-author

2 mensagens

Journal of Food Science and Technology <em@editorialmanager.com> 3 de julho de 2017 10:07
 Responder a: Journal of Food Science and Technology <maycee.lacorte@springer.com>
 Para: José Silva <dilson13@gmail.com>

Re: "Buffalo cheese whey hydrolyzed with alcalase as an antibrowning agent in minimally processed apple"
 Full author list: José Silva; Ana Correa; Carolina Kechinski; Adriano Brandelli

Dear Mr José Silva,

We have received the submission entitled: "Buffalo cheese whey hydrolyzed with alcalase as an antibrowning agent in minimally processed apple" for possible publication in Journal of Food Science and Technology, and you are listed as one of the co-authors.

The manuscript has been submitted to the journal by Dr. Professor Adriano Brandelli who will be able to track the status of the paper through his/her login.

If you have any objections, please contact the editorial office as soon as possible. If we do not hear back from you, we will assume you agree with your co-authorship.

Thank you very much.

With kind regards,

Springer Journals Editorial Office
 Journal of Food Science and Technology

Dilson Silva <dilson13@gmail.com> 3 de julho de 2017 10:07
 Para: Carolina Pereira Kechinski <carolinapk@ufcspa.edu.br>

----- Mensagem encaminhada -----

De: "Journal of Food Science and Technology" <em@editorialmanager.com>

Data: 3 de jul de 2017 10:07

Assunto: Journal of Food Science and Technology - Submission Notification to co-author

Para: "José Silva" <dilson13@gmail.com>

Cc:

[Texto das mensagens anteriores oculto]