

EFEITO DA DIGESTÃO *in vitro* NAS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DE HIDROLISADOS PROTEICOS DE SUBPRODUTOS DA PESCADA-OLHUDA

KARINA OLIVEIRA LIMA¹; CAROLINA DIAS MEDEIROS SAAD²; CAMILA DA COSTA DE QUADROS²; MERITAINE ROCHA²; CARLOS PRENTICE³

¹Universidade Federal do Rio Grande – karinah_ol@hotmail.com

²Universidade Federal do Rio Grande – csaad97@gmail.com; camillah@ymail.com; meritaine@gmail.com

³Universidade Federal do Rio Grande– dqmprent@furg.br

1. INTRODUÇÃO

Os subprodutos provenientes da industrialização de pescado possuem elevado teor proteico; sendo assim podem servir como matéria-prima para a obtenção de produtos de maior valor agregado como os hidrolisados proteicos (CHALAMAIAH et al., 2012; SILVA; BOUGATEF, 2016). Aliado a isso, os subprodutos correspondem cerca de 50% do pescado (LOPES et al., 2015). A pescada-olhuda (*Cynoscion guatucupa*) é um pescado comumente capturado na região Sul do Brasil (HAIMOVICI et al., 1989) e os subprodutos se tornam uma matéria-prima interessante para a obtenção de hidrolisados proteicos na região.

A hidrólise enzimática tem sido o método preferido para a obtenção de hidrolisados proteicos e peptídeos, pois não deixa resíduos tóxicos, possibilitando a posterior utilização em formulação alimentícias (NAJAFIAN; BABJI, 2012). Nesse contexto, os hidrolisados proteicos de pescado e espécies marinhas têm ganhado destaque pela diversa bioatividade, como: antioxidante, anti-hipertensiva, antimicrobiana, neuroprotetora, dentre outras (CAI et al., 2014; ELAVARASAN et al., 2016; LATORRES et al., 2018; ROCHA et al., 2018; SILVA; BOUGATEF, 2016; ZAMORA-SILLERO et al., 2018).

A busca por antioxidantes naturais é intensa, visto que o excesso de espécies reativas de oxigênio (EROs) no metabolismo resulta em estresse oxidativo, o qual tem sido associado ao aparecimento de diversas doenças (NAJAFIAN; BABJI, 2012; PISOSCHI; POP, 2015). No entanto, compostos bioativos necessitam resistir a condições de degradação por fatores endógenos durante a digestão para exercer um efeito fisiológico (ADITYA; ESPINOSA; NORTON, 2016; MOHAN et al., 2015). Assim, o objetivo do estudo foi avaliar o efeito da simulação da digestão *in vitro* sobre a atividade antioxidante de hidrolisados proteicos oriundos de subprodutos da pescada-olhuda, obtidos com as enzimas Alcalase e Protamex no grau de hidrólise de 10%.

2. METODOLOGIA

Como matéria-prima foi utilizada uma mistura de subprodutos (carne mecanicamente separada e aparas) de pescada-olhuda, proveniente de uma indústria de processamento de pescado da cidade de Rio Grande. A hidrólise enzimática foi realizada conforme o método descrito por Chi et al. (2015), com modificações. A matéria-prima e as enzimas foram utilizadas na proporção de 10% ($m_{\text{proteína}}/v$) e 2% de enzima-substrato proteico, respectivamente. Primeiro, foi realizada a inativação das enzimas endógenas (85°C/10 min), posteriormente a reação foi realizada nas condições ótimas de cada enzima, sendo para Alcalase (pH 8,0 e 50 °C) e Protamex (pH 7,0 e 50 °C). O grau de hidrólise foi monitorado pelo método de pH-stat segundo o método descrito por Adler-Nissen (1986) até

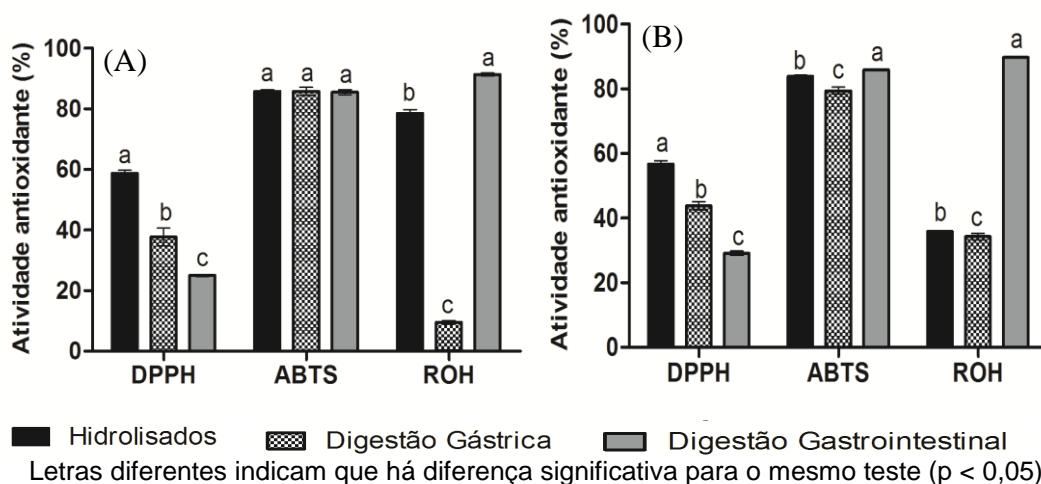
atingir o grau de hidrólise de 10%. A simulação da digestão gastrointestinal *in vitro* dos hidrolisados foi realizada de acordo com o descrito por Chai et al. (2013), com modificações. As amostras (3,5% m/v) foram dissolvidas em PBS (pH 7,4) e o pH ajustado para 2,0 seguido da adição da pepsina a uma concentração final de 4% (m/m, enzima/substrato) e incubadas a 37°C por 2 h para avaliar a digestão gástrica. Após, foi realizado o ajuste do pH para 5,3 com solução NaHCO₃ (0,9 M) e para 7,5 com NaOH (1M) seguido da adição da pancreatina a uma concentração final de 4% (m/m, enzima/substrato) e foram incubadas a 37°C por 4 h. A atividade antioxidante foi avaliada por 3 métodos: atividade de eliminação de radicais ABTS de acordo com Re et al. (1999) com adaptações de Zheng et al. (2016) para ensaio em microplacas, atividade sequestradora de radicais DPPH realizada de acordo com o descrito por Nicklisch e Waite (2014), com modificações, bem como atividade de eliminação de radicais hidroxila de acordo com o descrito por Jin et al. (2016), com modificações.

Os resultados foram tratados por análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey considerando um nível de 95% de confiança. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade antioxidante dos hidrolisados antes e após a simulação da digestão gástrica e gastrointestinal *in vitro* obtida por diferentes métodos são mostradas na Figura 1.

Figura 1– Atividade antioxidante do hidrolisado obtido com a enzima Alcalase (A) e do hidrolisado obtido com a enzima Protamex (B) pelos diferentes métodos.



Vários mecanismos devem ser utilizados para avaliar a atividade antioxidante de proteínas e peptídeos, em vista da composição por diferentes aminoácidos que possuem diferentes propriedades antioxidantes, sendo alguns mais eficazes como sequestrantes de radicais ou redutores de metais (ALEMÁN, GIMÉNEZ; MONTERO; GÓMEZ-GUILLÉN, 2011; KETNAWA et al., 2017).

A resistência à digestão gastrointestinal dos peptídeos é um fator crucial que deve ser avaliado para garantir efeitos fisiológicos, uma vez que podem ser degradados por uma série de peptidases quando submetidos ao trato gastrointestinal (GIANFRANCESCHI et al., 2018).

De acordo com os resultados apresentados na Figura 1, pode ser observado que para o ensaio de eliminação do radical DPPH ambas amostras apresentaram

decréscimo na atividade antioxidante após a digestão gástrica e gastrointestinal. De acordo com You et al. (2010), os peptídeos tornam-se mais solúveis em água depois de digeridos, o que pode ter dificultado a interação com o radical lipossolúvel.

Diferentemente do observado para o radical DPPH, para o radical ABTS as amostras mantiveram ou aumentaram a atividade antioxidante depois de submetidas a digestão. Esse fato pode ser explicado pelos peptídeos tornarem-se mais solúveis após o processo, facilitando a interação com o radical ABTS (YOU et al., 2010). Para o teste de eliminação do radical hidroxila, as amostras apresentaram um decréscimo na atividade antioxidante após a digestão gástrica e um aumento na capacidade de eliminação do radical após a digestão gastrointestinal. You et al. (2010) observaram um comportamento similar a este estudo encontrando uma atividade de eliminação de 78,9%; 64,3% e 88,5% para a amostra e após a digestão gástrica e gastrointestinal de hidrolisado de peixe-cobra (*Misgurnus anguillicaudatus*) obtido com a enzima papaína.

4. CONCLUSÕES

Foi comprovado que a simulação da digestão é uma ferramenta útil na avaliação da estabilidade da atividade antioxidante de hidrolisados proteicos *in vitro* frente à ação das enzimas digestivas. Dessa forma, foi possível observar que ambos hidrolisados continuaram apresentando atividade antioxidante após a digestão pelos três métodos analisados, sugerindo que os mesmos são bioacessíveis.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADITYA, N. P., ESPINOSA, Y. G., & NORTON, I. T. Encapsulation systems for the delivery of hydrophilic nutraceuticals: Food application. **Biotechnology Advances**, v. 35, p. 450–457, 2016.
- ADLER-NISSEN, J. **Enzymatic hydrolysis of food proteins**. London: Elsevier Applied Science Publishing, 1986.
- ALEMÁN, A., GIMÉNEZ, B., MONTERO, P., & GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. Antioxidant activity of several marine skin gelatins. **LWT – Food Science and Technology**, 44 (2), 407–413, 2011.
- CAI, L., WU, X., LV, Y., XU, Y., MI, G., & LI, J. The neuroprotective and antioxidant activities of protein hydrolysates from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, p. 3750–3755, 2014.
- CHAI, H. J., CHAN, Y. L., LI, T. L., SHIAU, C. Y., & WU, C. J. Evaluation of lanternfish (*Benthoosema pterotum*) hydrolysates as antioxidants against hydrogen peroxide induced oxidative injury. **Food Research International**, v. 54(2), p. 1409–1418, 2013.
- CHALAMAIAH, M., DINESH KUMAR, B., HEMALATHA, R., & JYOTHIRMAYI, T. Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review. **Food Chemistry**, v. 135(4), p. 3020–3038, 2012.
- CHI, C., HU, F., WANG, B., REN, X., DENG, S., & WU, C. Purification and characterization of three antioxidant peptides from protein hydrolyzate of croceine

- croaker (*Pseudosciaena crocea*) muscle. **Food Chemistry**, v. 168, p. 662–667, 2015.
- ELAVARASAN, K., SHAMASUNDAR, B. A., BADII, F., & HOWELL, N. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity and structural properties of oven- and freeze-dried protein hydrolysate from fresh water fish (*Cirrhinus mrigala*). **Food Chemistry**, v. 206, p. 210–216, 2016.
- GIANFRANCESCHI, G. L., GIANFRANCESCHI, G., QUASSINTI, L., & BRAMUCCI, M. Biochemical requirements of bioactive peptides for nutraceutical efficacy. **Journal of Functional Foods**, v. 47, p. 252–263, 2018.
- JIN, D. X., LIU, X. L., ZHENG, X. Q., WANG, X. J., & HE, J. F. Preparation of antioxidative corn protein hydrolysates, purification and evaluation of three novel corn antioxidant peptides. **Food Chemistry**, v. 204, p. 427–436, 2016.
- KETNAWA, S., BENJAKUL, S., MARTÍNEZ-ALVAREZ, O., & RAWDKUEN, S. Fish skin gelatin hydrolysates produced by visceral peptidase and bovine trypsin: Bioactivity and stability. **Food Chemistry**, v. 215, p. 383–385, 2017.
- LATORRES, J. M., RIOS, D. G., SAGGIOMO, G., WASIELESKY, W., & PRENTICE-HERNANDEZ, C. Functional and antioxidant properties of protein hydrolysates obtained from white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Journal of Food Science and Technology**, v. 55(2), p. 721–729, 2018.
- MOHAN, A., RAJENDRAN, S. R. C. K., HE, Q. S., BAZINET, L., & UDENIGWE, C. C. Encapsulation of food protein hydrolysates and peptides: a review. **RSC Advances**, v. 5(97), p. 79270–79278, 2015.
- NAJAFIAN, L., & BABJI, A. S. A review of fish-derived antioxidant and antimicrobial peptides: Their production, assessment, and applications. **Peptides**, v. 33(1), p. 178–185, 2012.
- NICKLISCH, S. C. T., & WAITE, J. H. Optimized DPPH assay in a detergent-based buffer system for measuring antioxidant activity of proteins. **Methods X**, v. 1, p. 233–238, 2014.
- PISOSCHI, A. M., & POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 55–74, 2015.
- ROCHA, M., ALEMÁN, A., ROMANI, V. P., LÓPEZ-CABALLERO, M. E., GÓMEZ-GUILLÉN, M. C., MONTERO, P., & PRENTICE, C. Effects of agar films incorporated with fish protein hydrolysate or clove essential oil on flounder (*Paralichthys orbignyanus*) fillets shelf-life. **Food Hydrocolloids**, v. 81, p. 351–363, 2018.
- SILA, A., & BOUGATEF, A. Antioxidant peptides from marine by-products: Isolation, identification and application in food systems. A review. **Journal of Functional Foods**, v. 21, p. 10–26, 2016.
- YOU, L., ZHAO, M., REGENSTEIN, J. M., & REN, J. Changes in the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates during a simulated gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, v. 120(3), p. 810–816, 2010.
- ZAMORA-SILLERO, J., RAMOS, P., MONSERRAT, J. M., & PRENTICE, C. Evaluation of the Antioxidant Activity In Vitro and in Hippocampal HT-22 Cells System of Protein Hydrolysates of Common Carp (*Cyprinus carpio*) By-Product. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 27(1), p. 21–34, 2018.
- ZHENG, L., ZHAO, M., XIAO, C., ZHAO, Q., & SU, G. Practical problems when using ABTS assay to assess the radical-scavenging activity of peptides: Importance of controlling reaction pH and time. **Food Chemistry**, v. 192, p. 288–294, 2016.