

Área: Ciência de Alimentos

CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE HIDROLISADOS DE ANCHOITA (*Engraulis anchoita*) PRODUZIDOS COM A ENZIMA PROTAMEX

Inajara Beatriz Brose Piotrowicz* e Myriam de las Mercedes Salas Mellado

Laboratório de Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS

**E-mail: inabbp@yahoo.com.br*

RESUMO – Neste trabalho foram produzidos diferentes hidrolisados de polpa de anchoita, utilizando a enzima Protamex, estudando a capacidade antioxidante dos peptídeos obtidos. Os valores de grau de hidrólise aumentaram com o aumento do tempo de reação, variando de 53,6% a 59,3%. Com relação à atividade antioxidante, o hidrolisado obtido em 3 horas de reação (P3) foi mais efetivo na captura do radical livre DPPH ($53,32 \pm 0,44\%$) e no poder redutor. Na composição aminoacídica do hidrolisado P3 se observou a presença de aminoácidos de grande interesse para crianças e adultos, além da existência relevante de aminoácidos essenciais.

Palavras-chave: pescado, hidrólise, peptídeos, antioxidantes.

1 INTRODUÇÃO

As proteínas hidrolisadas de pescado podem ser obtidas mediante um processo em que as enzimas atuam como catalisadores biológicos que aceleram a hidrólise, promovendo seu isolamento a partir de diferentes espécies. Como resultado da clivagem das ligações peptídicas, as proteínas são transformadas em peptídeos de diferentes tamanhos e em aminoácidos livres (ZAVAREZE et al., 2009).

Algumas espécies de pescado são descartadas ou consideradas como produto de baixo valor comercial. Isto se deve especialmente a elas apresentarem a carne escura, suscetível à oxidação e ao sabor residual (THIANSILAKUL et al., 2007). Diferentes fontes proteicas têm recebido maior atenção pelo seu potencial em originar peptídeos bioativos (CUDENNEC et al., 2008).

Os antioxidantes são compostos que retardam o aparecimento de alterações oxidativas em alimentos. As reações de formação de radicais livres dentro do alimento podem ser inibidas pela adição de compostos químicos, que podem retardar a formação desses radicais (SHIN-YOUNG et al., 2004).

A composição de aminoácidos de muitos alimentos proteicos possui um papel importante em diversas atividades fisiológicas do corpo humano e afeta outras direta ou indiretamente na manutenção da saúde. Os aminoácidos são essenciais para a síntese de uma variedade de proteínas que exercem variadas funções, incluindo o transporte de oxigênio, vitaminas, CO₂, enzimas e proteínas estruturais (CHALAMAIAH et al., 2012).

O objetivo deste trabalho foi obter hidrolisados proteicos de anchoita, pela ação da enzima Protamex, verificando a atividade antioxidante e o conteúdo de aminoácidos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A matéria prima foi a polpa de anchoita (*Engraulis anchoita*) que foi submetida à hidrólise com a enzima Protamex. A composição proximal da polpa foi realizada seguindo a metodologia analítica descrita pela AOAC (2000). Para a obtenção do hidrolisado foi utilizado o substrato [$2,0\%$ ($p_{\text{proteína}}/v_{\text{tampão}}$)] e enzima [$1,0\%$ ($p_{\text{enzima}}/p_{\text{proteína}}$)]. A reação se procedeu em pH 6,5, na temperatura de 50°C e nos tempos de 1, 3 e 5 horas. A desativação da enzima foi feita a 90°C/15 min. O hidrolisado foi centrifugado (3.220 g/15 min.) e o sobrenadante foi filtrado e liofilizado. Para a determinação do grau de hidrólise (GH) foi utilizado o método descrito por Adler-Nissen (1979), utilizando o ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS), utilizando a Equação 1.

$$\%GH = (x_1 \cdot 14,007 \cdot V_1 \cdot d \cdot 100) / (w \cdot V_2 \cdot 10000) \quad (1)$$

Onde foi relacionado ηmol de leucina lida na curva padrão (x_1), o volume (V_1) de amostra inicial preparada (25 mL) e o fator de diluição (d), com a massa (m) utilizado no teste (125 mg) e o volume (V_2) utilizado para a reação (250 μL).

A atividade antioxidante testada foi o efeito sequestrante do radical livre DPPH, realizada segundo Shimada et al. (1992), sendo expresso em porcentagem, conforme a Equação 2.

$$\%ES = [(ABS_{\text{branco}} - ABS_{\text{amostra}}) / (ABS_{\text{branco}})] \times 100 \quad (2)$$

O poder redutor foi medido segundo o método realizado por Oyazu (1988), sendo avaliado o aumento da absorbância da mistura da reação, o qual indica um aumento do poder redutor.

A composição dos aminoácidos totais foi determinada em amostras hidrolisadas com HCl 6 N por 22h a 110°C. Os aminoácidos foram separados segundo o protocolo de separação desenvolvido por Bidlingmeyer et al. (1984).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores de composição da polpa de anchoita foram de 79,3 % de umidade, 16,5 % de proteína, 2,0 % de lipídeos e 1,2 % de cinzas, sendo semelhantes aos valores obtidos por Furlan et al. (2009). Segundo Yeannes e Almandos (2003), a composição varia com os tecidos, sexo, idade do pescado e estação do ano, o que pode explicar as diferenças com a literatura para esta espécie.

Os valores de GH obtidos foram de 53,6%, 54,7% e 59,3%, nos tempos de 1, 3 e 5 horas, respectivamente. O aumento do GH com o tempo é esperado, pois a ação da enzima provoca a liberação de peptídeos e aminoácidos com grupamentos amino expostos para agir com o TNBS. Kechaou et al., (2009) encontraram valores de grau de hidrólise para hidrolisados de vísceras de lula e sardinha, com a enzima Protamex em 24 horas de reação, de 3,2% e 3,1%, respectivamente. O baixo valor, relacionado com os hidrolisados de anchoita, provem da menor concentração de enzima (0,1%), que foi dez vezes menos ao utilizado neste estudo.

Na Tabela 1 estão presentes os valores de efeito sequestrante do radical DPPH e poder redutor dos hidrolisados de anchoita com a enzima Protamex.

Tabela 1: Médias e desvio padrão dos valores de efeito sequestrante do radical DPPH e poder redutor dos hidrolisados de polpa de anchoita.

	Hidrolisado		
	P1	P3	P5
DPPH	39,7±0,1 ^b	53,3±0,4 ^a	34,9±0,4 ^c
Poder redutor	0,028±0,005 ^b	0,110±0,006 ^a	0,017±0,003 ^b

P1, P3, P5: hidrolisados de polpa de anchoita obtidos com a enzima Protamex nos tempos de reação de 1, 3 e 5 horas, respectivamente. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os hidrolisados.

O hidrolisado com 3 horas de hidrólise foi o que apresentou maior poder sequestrante do radical livre DPPH. You et al.(2009), com hidrolisados de *Misgurnus anguillicaudatus*, obtiveram valores de sequestro do radical DPPH entre 80% e 90%, porém com uma solução de concentração de 40 mg/mL, superior ao utilizado neste trabalho (5 mg/mL). Através da medida do poder redutor é possível verificar a capacidade antioxidante expressa pela variação da absorbância (700 nm), mostrando que o hidrolisado P3 apresentou atividade maior em comparação aos demais.

Na Tabela 2 está apresentada a composição aminoacídica do hidrolisado de polpa de anchoita com melhor atividade antioxidante (P3).

Tabela 2: Perfil de aminoácidos do hidrolisado de anchoita produzido pela enzima Protamex em 3 horas de reação.

Aminoácido	mg /g proteína				
	Hidrolisado	Bebês**	2-5 anos**	10-12 anos**	Adultos**
Asp	113,65±2,69	-	-	-	-
Glu	172,92±2,57	-	-	-	-
Ser	43,49±0,45	-	-	-	-
Gly	45,41±1,33	-	-	-	-
His	33,08±0,22	26	19	19	16
Arg	53,64±2,61	-	-	-	-
Thr*	45,88±1,94	43	34	28	9
Ala	61,95±0,70	-	-	-	-
Pro	39,12±7,69	-	-	-	-
Tyr	29,36±0,79	-	-	-	-
Val	49,53±0,83	55	35	25	13
Met*	40,25±0,36	42 ^a	25 ^a	22 ^a	17 ^a
Ile*	39,03±1,48	46	28	28	13
Leu*	99,08±0,76	93	66	44	19
Phe*	41,82±0,19	72 ^b	63 ^b	22 ^b	19 ^b
Lys*	111,39±2,0	66	58	44	1,6
Cys	nd	-	-	-	-

* Aminoácidos essenciais. ** Perfil de aminoácidos essenciais sugerido para bebês, crianças (2-5 e 10-12 anos) e adultos (FAO/WHO, 1989). a: valores referentes à metionina + cisteína; b: valores referentes à fenilalanina + tirosina; nd: aminoácido não detectado.

A amostra possui o perfil de aminoácidos acima do limite sugerido pela FAO/WHO (1989) para o consumo de crianças de 2-5 e 10-12 anos e para adultos. Os aminoácidos constituintes e a sequência nos peptídeos são importantes para a sua atividade antioxidante. Isto tem sido demonstrado pela presença de aminoácidos hidrofóbicos e de um ou mais resíduos de histidina, prolina, metionina, cisteína, tirosina, triptofano e fenilalanina, que podem aumentar a bioatividade dos peptídeos (You et al., 2010). Esses aminoácidos estavam presentes no hidrolisado, exceto a cisteína, que não foi detectada. A existência de sequências hidrofóbicas poderia interagir com moléculas lipídicas e poderiam sequestrar, doando prótons aos radicais derivados de lipídios (Je et al., 2007).

4 CONCLUSÃO

A atividade antioxidante de hidrolisados de anchoita produzidos com a enzima Protamex em diferentes tempos de hidrólise foi estudada, obtendo produtos com diferentes graus de hidrólise e capacidade bioativa. No sequestro do radical livre DPPH e no poder redutor, o hidrolisado P3 foi o mais efetivo, demonstrando maior poder antioxidante. O hidrolisado P3 apresentou valores satisfatórios no perfil de aminoácidos, podendo ser benéficos por se tornar um produto funcional.

5 REFERÊNCIAS

- ADLER-NISSEN, J. Determination of the degree of hydrolysis of food feed protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 27, n. 6, 1256-1262, 1979.
- AOAC.(ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS).**Official methods of analysis**.17^o ed., v. 2, Gaithersburg, 2000.
- BIDLINGMEYER, B.A.; COHEN, S.A.; TARVIN, T.L. Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization. **Journal of Chromatography**, v. 336, p.93-104, 1984.
- CHALAMAIAH, M. A; DINESH KUMAR, B. A; HEMALATHA, R. B; JYOTHIRMAYI, T. Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review. **Food Chemistry**, v. 135, p. 3020–3038, 2012.
- CUDENNEC, B.; RAVALLEC-PLÉC, R.; COUROIS, E.; FOUCHEREAU-PERON, M. Peptides from fish and crustacean by-products hydrolysates stimulate cholecystokinin release in STC-1 cells. **Food Chemistry**, v. 111, p. 970–975, 2008.
- FAO/WHO. Protein Quality Evaluation: Report of the Joint FAO/WHO Expert Consultation, Bethesda, Md., USA, Edição 51, 1989.
- FURLAN, V. J. M.; SILVA, A. P. R.; QUEIROZ, M. I. Avaliação da eficiência de extração de compostos nitrogenados da polpa de anchoita (*Engraulis anchoita*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.29, n. 4, p. 834-839, 2009.
- KECHAOU, E. S.; DUMAY, J.; DONNAY-MORENO, C.; JAOUEN, P.; GOUYGOU, J. P.; BERGÉ, J. P.; AMAR, R. B. Enzymatic hydrolysis of cuttlefish (*Sepia officinalis*) and sardine (*Sardina pilchardus*) viscera using commercial proteases: Effects on lipid distribution and amino acid composition. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 107, n. 2, p. 158-164, 2009.
- OYAZU, M. Antioxidative activitie of browning products of glucosamine fractioned by organic solvent and thin-layer chromatography. **Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi**, v. 35, p. 771-775, 1988.
- SHIMADA, K., FUJIKAWA, K., YAHARA, K.; NAKAMURA, T. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 945–948, 1992.

SHIN-YOUNG, J.; PYO-JAM, P.; WON-KYO, J.; SE-KWON, K. Purification and characterization of an antioxidative peptide from enzymatic hydrolysate of yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein.

Europe Food Research Technology, v. 219, p. 20–26, 2004.

THIANSILAKUL, Y.; BENJAKUL, S.; SHAHIDI, F. Compositions, functional properties and antioxidative activity of protein hydrolysates prepared from round scad (*Decapterus maruadsi*).

Food Chemistry, v. 103, p. 1385–1394, 2007.

YEANNES, M. I.; ALMANDOS, M. E. Estimation of fish proximate composition starting from water content.

Journal of Food Composition and Analysis, v. 16, n. 1, p. 81-92, 2003.

YOU, L.; ZHAO, M.; CUI, C.; ZHAO, H.; YANG, B. Effect of degree of hydrolysis on the antioxidant activity of loach (*Misgurnusanguilli caudatus*) protein hydrolysates.

Innovative Food Science and Emerging Technologies, v. 10, p. 235–240, 2009.

YOU, L.; ZHAO, M.; REGENSTEIN, J. M.; REN, J. Purification and identification of antioxidative peptides from loach (*Misgurnusanguilli caudatus*) protein hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry.

Food Research International, v. 43, p. 1167–1173, 2010.

ZAVAREZE, E. R.; SILVA, C. M.; SALAS-MELLADO, M.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Funcionalidade de hidrolisados proteicos de cabrinha (*Prionotus punctatus*) obtidos a partir de diferentes proteases microbianas.

Quimica Nova, v. 32, n. 7, p. 1739-1743, 2009.