

Área: Tecnologia de Alimentos

AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTI-HIPERTENSIVA E ANTIDIABÉTICA DE HIDROLISADO PROTEICO DE PESCADO

Meritaine da Rocha*, Ailén Alemán², Elvira López-Caballero², Oscar Martínez-Alvarez², Carlos Prentice¹.

¹Laboratório de Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Escola de Química de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS.

²Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos e Nutrição – ICTAN, Departamento de Produtos, Madri, Espanha

*E-mail: meritaine@gmail.com

RESUMO – O objetivo do presente estudo foi a avaliação da capacidade anti-hipertensiva e antidiabética de hidrolisado proteico proveniente de isolado proteico de castanha (*Umbrina canosai*). Para tanto, foram elaborados hidrolisados proteicos com grau de hidrólise de 10 e 20% utilizando a enzima Alcalase e como substrato o isolado proteico de castanha (*Umbrina canosai*). O isolado proteico elaborado apresentou um conteúdo elevado de proteínas (92,14%) e baixo de lipídeos (1,18%). Os hidrolisados elaborados apresentaram atividade na inibição das enzimas dipeptidil peptidase e conversora de angiotensina. Contudo, o hidrolisado com grau de hidrólise de 20% apresentou valores de inibição das enzimas dipeptidil peptidase (0,44 µg/µL) e conversora de angiotensina (74,36%) significativamente ($p < 0,05$) superiores ao hidrolisado com menor grau de hidrólise, indicando a influencia do grau de hidrólise nessas bioatividades. O isolado proteico de castanha mostrou-se uma promissora matéria prima para o desenvolvimento de hidrolisado proteico com propriedades anti-hipertensivas e antidiabéticas os quais podem ser adicionados em alimentos funcionais.

Palavras-chave: Hidrolisado, anti-hipertensivo, antidiabético

1 INTRODUÇÃO

A hipertensão é um problema de epidemia mundial, afetando cerca de 20% da população adulta do mundo. Ela é um fator de risco de doenças como arteriosclerose, acidente vascular cerebral, infarto do miocárdio e insuficiência renal. O controle da pressão arterial é essencial para a prevenção e controle dessas doenças. No corpo humano, a pressão sanguínea é regulada pelo sistema renina-angiotensina, no qual a renina catalisa o angiotensinogênio para produzir a angiotensina I, que é adicionalmente clivado pela enzima conversora de angiotensina I (ECA) à angiotensina II, um vasoconstritor potente e um inibidor do vasodilatador bradicinina. Estão sendo realizados diversos estudos de peptídeos provenientes de recursos marinhos com a propriedade de inibição dessa enzima (Alemán et al., 2011; Sila et al., 2015).

Na última década, um grande número de estudos tem sido realizados para avaliar as propriedades biológicas de hidrolisados provenientes de espécies aquáticas (Alemán et al., 2011; Najafian e Babji, 2012; Sila et al. 2015). Contudo, os efeitos antidiabéticos não são largamente estudados. A diabetes *mellitus* tipo 2 é um problema de saúde pública importante e crescente em todo o mundo, a qual desperta o interesse por novos compostos que contribuam para minimização da mesma. Os inibidores da enzima dipetidil peptidase IV (DPP-IV) representam uma nova classe de agentes antidiabéticos, que melhoram o controle glicêmico através do bloqueio da DPP-IV, prolongando o efeito incretina (Najafian e Babji, 2012; Sila et al., 2015).

O porto da cidade do Rio Grande, o maior centro pesqueiro do Rio Grande do Sul, oferece uma ampla gama de espécies de pescado de baixo valor comercial, tal como a castanha (*Umbrina canosai*), que podem ser estudadas com a finalidade de transformar essa matéria prima em produtos de alto valor agregado. O pescado pode ser uma fonte alternativa de materiais funcionais como, por exemplo, ácidos graxos poliinsaturados, minerais, vitaminas, antioxidantes e peptídeos bioativos (Najafian e Babji, 2012). Os peptídeos bioativos podem ser produzidos por três métodos: extração por solvente, hidrólise enzimática e fermentação microbiana de proteínas. O método de hidrólise enzimática é preferido nas indústrias de alimentos e farmacêutica, pois os outros métodos podem deixar resíduos de solventes orgânicos ou de substâncias tóxicas nos produtos. Os peptídeos bioativos estão inativos dentro das sequências das proteínas. Eles são liberados por hidrólise enzimática e em seguida, eles podem exercer várias funções fisiológicas (Najafian e Babji, 2012). Neste contexto o objetivo do presente trabalho, foi a avaliação da capacidade anti-hipertensiva e antidiabética de hidrolisado proteico proveniente de isolado proteico de castanha (*Umbrina canosai*).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

Os filés do pescado, castanha, foram fornecidos por uma indústria pesqueira da cidade do Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil. A castanha foi capturada no litoral sul do Rio Grande do Sul e em seguida transportada para a indústria processadora. Em seguida, foi higienizada em água clorada (5 ppm) a 4 °C, descabeçada, eviscerada e fileteada. Os músculos foram transportados para o Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG) em caixas herméticas e armazenados a – 18°C até o momento do uso. A enzima utilizada foi a Alcalase, uma endopeptidase bacteriana produzida a partir do *Bacillus licheniformis*. A Alcalase foi fornecida pela empresa Novozymes, de Araucária, estado do Paraná. Os reagentes utilizados no presente estudo foram de grau analítico (P.A).

2.2 Obtenção do isolado proteico

O isolado proteico de castanha (IPC) foi obtido através do método de variação de pH, conforme descrito por Nolsøe e Undeland (2009) com modificações. Os músculos de castanha foram homogeneizados em água destilada na proporção 1:9 (p/v) em reator de aço inoxidável acoplado de banho ultratermostático (Quimis, Q212S, Diadema, Brasil) a 4 °C sob agitação constante com agitador eixo-hélice (IKA, RW 20DZM.n, Alemanha) durante 1 min. Em seguida, foi realizada a solubilização em pH 11,2 (NaOH 1 M) durante 20 min a 4

°C sob agitação constante. Após, as amostras foram centrifugadas a 9000 x g (Hanil, Supra 22K, Coréia do Sul) durante 20 min a 4 °C. O pH das proteínas solúveis foi ajustado em pH 5,0 (HCl 1 M) durante 20 min a 4 °C sob agitação constante. Após, as amostras foram centrifugadas a 9000 x g durante 20 min a 4 °C. O precipitado, isolado proteico, foi liofilizado (Liotop, São Carlos, Brasil), triturado em moinho de facas (Tecnal, TE-633, Piracicaba, Brasil) e peneirado em peneira de 42 mesh (Bertel, Caieiras, Brasil). O isolado proteico foi armazenado a - 18 °C até o momento de uso. A composição proximal do IPC foi determinada em triplicata segundo metodologia descrita pela AOAC (2000), com n° de 992,15; 923,03; 960,39; e 925,30; para determinação de proteína, cinzas, umidade e lipídeos, respectivamente.

2.3 Obtenção do hidrolisado proteico

A hidrólise enzimática do isolado proteico da castanha (IPC) foi realizada utilizando a enzima Alcalase segundo metodologia descrita por Liu et al. (2014) e Raghavan e Kristinsson (2009) pelo método de pH-stat, com modificações. O IPC foi homogeneizado em água destilada na proporção de 2% (p/v) em reator de vidro encamisado acoplado de banho ultratermostático (Quimis, Q212S, Diadema, Brasil) sob agitação constante em agitador a 300 rpm. A condição da dispersão proteica foi ajustada na seguinte condição: pH: 8, temperatura de 50 °C e enzima 30 U/g proteína, respectivamente. O grau de hidrólise (GH) foi monitorado segundo a equação de Adler-Nissen (1986). A hidrólise foi realizada até que a amostra atingisse um grau de hidrólise de 10 e 20%.

2.4 Atividade hipoglicemiante

A capacidade de inibição da enzima dipeptidil peptidase – IV (DPP – IV) foi determinada segundo metodologia descrita por Tulipano et al. (2011), com algumas modificações. O ensaio foi realizado em triplicata em uma placa de 96 poços. Inicialmente, cerca de 10 µL de DPP – IV, previamente diluído em tampão Tris-HCl 100 mM em pH 8, foram incubados em diferentes concentrações de amostra, diluídas em tampão Tris-HCl 100 mM em pH 8, a 37°C durante 15 min. Então, foram adicionados 100 µL de substrato cromogênico (H-Gly-Pro-AMC-HBr) em uma concentração final de 25 µM. A variação na fluorescência a 355/460 nm foi monitorada a cada 2 min durante 30 min em leitor de placas Appliskan (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos). A atividade inibidora foi calculada a partir dos dados obtidos em ausência ou na presença da amostra de teste em diferentes concentrações. A regressão logarítmica foi usada para calcular o valor IC₅₀, ou seja, a concentração de hidrolisado necessária para inibir 50% da atividade da DPP-IV.

2.5 Atividade anti-hipertensiva

A capacidade das amostras na inibirem a enzima conversora de angiotensina (ECA) foi determinada segundo Wu et al. (2002). O volume total da reação foi de 230 µL, composto por 50 µL de Hipuril-histidil-leucina (HHL) 5 mM, 160 µL de ECA (0,025 U/mL) e 20 µL das amostras diluídas em tampão fosfato de potássio 100 mM (contendo 300 mM de NaCl, pH 8,3). A solução foi incubada a 37°C em banho-maria (Grant Instruments Ltda, OSL 200, Cambridge, Inglaterra) sob agitação constante de 160 rpm. A reação foi interrompida pela adição de 100 µL de HCl (0,1 M). O ácido hipúrico (HA) liberado foi quantificado através de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC) em cromatógrafo (Shimadzu, SPE-

MA10AVP, Kyoto, Japão). O HA e o HHL foram monitorados a 228 nm nos tempos de retenção de 8,30 e 15,7 min, respectivamente. Um valor de 100% atividade inibidora da ECA indicou que ocorreu total inibição e nenhuma diminuição na absorbância foi observada. As determinações foram avaliadas em triplicata, como apresenta a equação:

$$\text{Inibição da ECA (\%)} = (\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{amostra}}) / \text{Abs}_{\text{amostra}} \times 100$$

Onde, $\text{Abs}_{\text{amostra}}$ a absorbância da mistura enzima-substrato sem a presença de hidrolisados proteicos; $\text{Abs}_{\text{amostra}}$ é a absorbância da mistura enzima-substrato na presença do hidrolisado proteico.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta a composição proximal do IPC obtido pelo método de variação de pH.

Tabela 1 – Composição proximal do isolado proteico

Componente	IPC
Proteína (%)	92,13 ^a ± 0,02
Água (%)	2,25 ^b ± 0,08
Lípídeos (%)	1,18 ^d ± 0,07
Cinzas (%)	1,51 ^c ± 0,07

Valores médios ± desvio padrão (n=3); Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p > 0,05$).

O IPC obtido no presente estudo apresentou um teor proteico elevado quando comparado ao obtido em estudos de Rocha et al. (2013) e Zavareze (2012), os quais obtiveram 88,8% e 83,33% de proteína para isolado proteico de anchoita (*Engraulis anchoita*) e de corvina (*Micropogonias furnieri*), respectivamente. Segundo Yarnpakdee et al. (2014) durante o a solubilização alcalina, as proteínas são facilmente dissociadas e como resultado os lípídeos são liberados facilmente, devido a isso verificamos o baixo conteúdo de lípídeos encontrados no presente estudo em relação ao conteúdo proteico do mesmo. Rocha et al. (2013) verificaram que isolado proteico obtido a partir de anchoita (*Engraulis anchoita*) apresentou um conteúdo de cinzas de 1,0%, sendo este inferior ao encontrado no presente estudo. Essas diferenças observadas segundo Nolsøe e Undeland (2009) pode ocorrer devido ao método utilizado, pH, temperatura entre outros para obtenção do isolado proteico.

A amostra de hidrolisado proteico com GH de 20% apresentou melhor inibição da DPP – IV (0,44 µg/µL) e da enzima conversora de angiotensina – ECA (74,36%). Sila et al. (2015) em seus estudos com hidrolisados proteicos de gelatina de pele de peixe (*Barbus callensis*) com GH de 14,17% utilizando a enzima Alcalase, verificaram que para a inibição de 50% da DPP-IV eram necessários um conteúdo 2,64 µg/µL de hidrolisado, superior ao encontrado no presente estudo com GH de 10 e 20%, respectivamente. Silveira et al. (2013) inibiram 50% da DPP-IV, através do uso de 1,51 µg/µL de hidrolisado proteico de soro de leite utilizando a enzima Tripsina.

A Tabela 2 apresenta as atividades anti-hipertensiva (ECA) e inibidora da DPP-IV dos hidrolisados proteicos obtidos de IPC.

Tabela 2 – Atividades dos hidrolisados proteicos de IPC

Grau de hidrólise - GH (%)	IC ₅₀ DPP-IV (µg/µL)	ECA (%)
10	0,52 ^a ± 0,01	61,81 ^b ± 1,65
20	0,44 ^b ± 0,00	74,36 ^a ± 4,82

Valores médios ± desvio padrão (n=3); Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p > 0,05$).

Os resultados apresentados no presente estudo indicam que quanto o maior GH alcançado, melhor são as propriedades bioativas dos hidrolisados proteicos. O DH representa a porcentagem de ligações peptídicas clivadas em relação ao número total de ligações peptídicas e, dependendo da extensão da hidrólise, pode resultar na formação de peptídeos com baixa massa molecular, em consequência melhores inibições da ECA e DPP-IV. Segundo Li-Chan et al. (2012) a atividade de inibição da DPP-IV está relacionado com o tamanho dos peptídeos, o que foi verificado no presente estudo onde o maior grau de hidrólise resultou em maior inibição da mesma. Nasri et al. (2013) elaboraram hidrolisados proteicos de Gobi (*Zosterisessor ophiocephalus*) com GH de 28,4%, os quais apresentaram uma capacidade de inibição da ECA (87,5%), superior ao encontrado no presente estudo. A atividade inibitória dos hidrolisados não está ligada somente a composição de aminoácidos, mas também pelo perfil de sequência desses aminoácidos.

4 CONCLUSÃO

Os hidrolisados elaborados apresentaram boas propriedades de inibição das enzimas dipeptidil peptidase e conversora de angiotensina, respectivamente. O acréscimo no grau de hidrólise influenciou positivamente nas bioatividades do hidrolisado testado. O isolado proteico de castanha mostrou-se uma promissora matéria prima para o desenvolvimento de hidrolisado proteico com propriedades anti-hipertensivas e antidiabéticas os quais podem ser adicionados em alimentos funcionais.

5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq e a FAPERGS pelo apoio financeiro para o desenvolvimento do presente estudo.

6 REFERÊNCIAS

AOAC - Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis**. 17ª edição. Maryland: AOAC, 2000.

- ALEMÁN, A.; PÉREZ-SANTIN, E.; BORDENAVE-JUCHEREAU, S.; ARNAUDIN, I.; GÓMEZ-GUILLÉN, C.; MONTERO, P. Squid gelatin hydrolysates with antihypertensive, anticancer and antioxidant activity. **Food Research International**, v. 44, n. 4, p. 1044–1051, 2011.
- LIU, Y.; LI, X.; CHEN, Z.; YU, J.; WANG, F.; WANG, J. Characterization of structural and functional properties of fish protein hydrolysates from surimi processing by-products. **Food Chemistry**, 151, 459–465, 2014.
- NAJAFIAN, L.; BABJI, A.S.; A review of fish-derived antioxidant and antimicrobial peptides: their production, assessment, and applications. **Peptides**, v.33, p.178-185, 2012.
- NASRI, R.I.; YOUNES, M.; JRIDI, M. TRIGUI, A. BOUGATEF, N. NEDJAR-ARROUME. ACE inhibitory and antioxidative activities of Goby (*Zosterisessor ophiocephalus*) fish protein hydrolysates: effect on meat lipid oxidation. *Food Research International*, 54, 552–561, 2013.
- RAGHAVAN, S.; KRISTINSSON, H.G. ACE-inhibitory activity of tilapia protein hydrolysates. **Food Chemistry**, 117, 582–588, 2009.
- NOLSØE, H.; UNDELAND, I. The acid and alkaline solubilization process for the isolation of muscle proteins: State of the art. **Food and Bioprocess and Technology**, 2, 1-27, 2009
- ROCHA, M.; LOIKO, M.R.; GAUTÉRIO, G.; TONDO, E.C.; PRENTICE, C. Influence of heating, protein and glycerol concentrations of film-forming solution on the film properties of Argentine anchovy (*Engraulis anchoita*) protein isolate. **Journal of Food Engineering**, v. 116, p. 666-673, 2013.
- SILA, A.. Recovery, viscoelastic and functional properties of Barbel skin gelatine: Investigation of anti-DPP-IV and anti-prolyl endopeptidase activities of generated gelatine polypeptides. **Food Chemistry**, v. 168, p. 478–486, 2015.
- TULIPANO, G., SIBILIA, V., CAROLI, A. M., COCCHI, D. Whey proteins as source of dipeptidyl dipeptidase IV (dipeptidyl peptidase-4) inhibitors. **Peptides**, 32, 835–838 , 2011.
- WU, H.; HE H.L.; CHEN, X.L.; SUN C.Y.; ZHANG, Y.Z. Zhou BC. Purification and identification of novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from shark meat hydrolysate. **Process Biochemistry**, 43:457–6, 2008.
- YARNPAKDEE, S., BENJAKUL, S., PENJAMRAS, P., KRISTINSSON, H. G. Chemical compositions and muddy flavour/odour of protein hydrolysate from Nile tilapia and broadhead catfish mince and protein isolate. **Food Chemistry**, 142 (1), 210–216, 2014.
- ZAVAREZE, E.R. **Produção e aplicação de filmes bioativos com inclusão de hidrolisados proteicos nanoencapsulados provenientes de corvina (*Micropogonias furnieri*)**. Tese (Doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 116p, 2012.