

Área: Tecnologia de Alimentos

TEOR DE GRUPOS SULFIDRILA EM HIDROLISADOS PROTÉICOS OBTIDOS A PARTIR DE MÚSCULOS DE BIJUPIRÁ (*Rachycentron canadum*)

**Renata Aline dos Santos Fonseca*, Carolina Moroni Silva, Giordan Fernandes da
Rosa, Carlos Prentice-Hernandez**

*Laboratório de Tecnologia de Alimentos, Curso de Engenharia de Alimentos, Escola de Química e Alimentos,
Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS.*

**E-mail: re_aline.ea@gmail.com*

RESUMO. Com o crescimento da população mundial, e o avanço de estudos relacionados a aditivos alimentares com possíveis atividades carcinogênicas, faz-se necessária a descoberta de alternativas para agregar valores nutricionais e comerciais a alimentos, e uma forma de tal é a modificação enzimática de proteínas. Logo, o objetivo desse trabalho foi analisar o teor de grupos sulfidrila (-SH) de hidrolisados protéicos de músculo de bijupirá (*Rachycentron canadum*) obtidos através da ação das enzimas Alcalase, Flavourzyme e Protamex. Os maiores teores encontrados para as amostras, em $\mu\text{mol-SH/g}$ de proteína, foram os valores de 25,83 para a Flavourzyme e 10,96 para a Protamex nas frações maiores que 3 kDa, e 10,14 para a Flavourzyme no hidrolisado integral. Os resultados mostraram que a enzima Flavourzyme geral, sobre os músculos de bijupirá, um hidrolisado com maior teor de grupos sulfidrila e que o fracionamento aumenta esse teor, sugerindo que a ultrafiltração pode ser utilizada para potencializar essa resposta.

Palavras-chave: grupos sulfidrila, hidrólise, bijupirá, músculo, ultrafiltração.

1. INTRODUÇÃO

O bijupirá é um peixe pertencente a uma espécie capaz de desenvolver-se em elevadas taxas de velocidade, principalmente em zonas temperadas, podendo alcançar até 8 kg em um ano de criação. Além disso, produz carne de alta qualidade mesmo sendo cultivado em cativeiros com espaço reduzido. Tais características o tornaram um peixe atrativo à piscicultura atualmente (LIAO, et al. 2007; OESTERLING, 2001).

A indústria se utiliza das propriedades funcionais das proteínas do pescado para produzir novos alimentos, como é o caso do surimi, do kamaboko e dos análogos; tecnologias emergentes no mercado do ocidente, porém seculares no oriente (OETTERER, 1996).

Estudos recentes revelaram uma ampla gama de aplicações dos hidrolisados proteicos de pescado (HPP), como novas fontes de peptídeos bioativos relacionados com o sistema imunológico, opiáceos, antioxidante, anti-

hipertensivo, entre outros (CENTENARO, 2011; GUÉRARD et al., 2010; SILVA, 2014). Dentre tais propriedades e funções está a de antioxidante, onde os compostos sintéticos mais utilizados atualmente são butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), e terc-butil-hidroquinona (TBHQ). Estudos comprovam que estes vêm sendo suprimidos do mercado em função de possíveis efeitos cancerígenos e alguns outros problemas de saúde (RAMALHO & JORGE, 2006). Uma das diversas formas de prever o potencial antioxidante do hidrolisado é determinar o teor de grupos redutores sulfidríla (-SH), oriundos do aminoácido cisteína ou do peptídeo glutationa, ambos capazes de desempenhar papéis importantes no organismo, tanto na regulação quanto na defesa antioxidante da saúde humana (WU, et al. 2004).

O objetivo deste trabalho é, portanto, o de determinar o teor de grupos sulfidríla (-SH) em hidrolisados protéicos de músculo de bijupirá, com a intenção de encontrar um antioxidante alternativo para ser utilizado pela indústria de alimentos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Matéria-prima

A matéria prima utilizada neste trabalho foi o músculo do bijupirá. Após ser lavado com água clorada 5 ppm, o pescado foi descabeçado, eviscerado e filetado. Após esse procedimento foram acondicionados em embalagens plásticas de polietileno, sendo então, armazenados sob congelamento a -18 ± 2 °C até a utilização.

2.2 Enzimas e reagentes

As enzimas utilizadas foram: Alcalase e Flavourzyme (Novozymes) e Protamex (Sigma-Aldrich) e os reagentes foram de grau analítico (P.A.).

2.3 Obtenção dos hidrolisados protéicos

Os hidrolisados enzimáticos foram obtidos a partir do músculo do pescado, baseando-se no processo sugerido por Kristinsson e Rasco (2000). Primeiramente, as matérias primas foram homogeneizadas em água destilada (1:8) utilizando as condições de concentração de enzima e substrato proteico 1:10, de acordo com a atividade específica de cada enzima, determinada através do método descrito por Sigma (1999) e a proteína através de Lowry et al. (1951).

Para a obtenção dos hidrolisados foram utilizadas 3 enzimas em separado: Alcalase (99,75 U/g de enzima, pH 8,0 e temperatura de 50 °C), Flavourzyme (2,07 U/g de enzima, pH 7,0 e temperatura de 50 °C) e Protamex (8,41 U/g de enzima, pH 7,0 e temperatura de 40 °C), em que U corresponde a μmol de tirosina livre/min (JUNG et al., 2006). A reação ocorreu em um reator de vidro, de parede dupla, conectado a um banho termostaticado (BROOKFIELD TC/102 – EUA), sob agitação mecânica de 600 rpm e controle de pH. Antes do início das hidrólises, as enzimas endógenas foram inativadas (85 °C por 15 min). As hidrólises foram

interrompidas quando o grau de hidrólise se tornou constante, de acordo com o método descrito por Adler-Nissen em 1986.

Após, foi realizada a inativação da enzima (90 °C/10 min) em banho termostatizado. Os hidrolisados protéicos foram então arrefecidos e centrifugados (3.500 x g por 20 min) e os sobrenadantes liofilizados e armazenados a -18 ± 2 °C.

2.4 Fracionamento dos hidrolisados proteicos utilizando ultrafiltração (UF)

Os hidrolisados foram fracionados utilizando uma célula de UF (300 mL, Advantec MFS Inc., Japão Mod. UHP-76) com agitação magnética. As membranas de UF (Millipore Corporation, Billerica, U.S.A., de celulose regenerada, 76 mm de diâmetro) apresentam massa molar de corte (*cut-off*) de 3 kDa. Antes de cada filtração as membranas foram lavadas com água ultrapura, e após foi utilizada uma pressão transmembrana de 55 psi por 5 min para retirada da água. Durante cada processo de filtração aplicou-se pressão com gás nitrogênio de 60 psi, agitação de 400 rpm e temperatura de 21 ± 1 °C. As amostras foram passadas através das membranas em uma concentração de 7,5 mg/mL (CARREIRA et al. 2003) onde foram coletadas 2 frações: retentado (fração maior que 3 kDa) e permeado (fração menor que 3 kDa). Em seguida as amostras foram congeladas à -80 °C por 48 h e liofilizadas para posterior avaliação de atividade antioxidante.

2.5 Determinação dos grupos sulfidril dos hidrolisados e das frações peptídicas

O teor total dos grupos sulfidril (T-SH) foi determinado utilizando o reagente de Ellman (5,5 ditiobiss-ácido 2-nitrobenzóico, 10 mmol/L) de acordo com o procedimento descrito por Shimada e Cheftel (1988) com algumas modificações. Amostras de 100 mg de hidrolisado liofilizado foram homogeneizadas durante 3 min com 50 mL de tampão fosfato 0,1 mol/L, pH 8,0, contendo EDTA 1 mmol/L, 6 mol/L uréia e 0,5 % SDS. A mistura foi então centrifugada (8667 x g por 20 min). Em 3 mL do sobrenadante foram adicionados 30 µL do reagente de Ellman e deixou-se processar a reação por 15 min à temperatura ambiente. Após, a absorbância da mistura foi medida a 412 nm em espectrofotômetro e os grupos R-SH determinados utilizando um coeficiente de extinção molar de $13600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (BEVERIDGE; JONES; TUNG, 1986).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 1 apresenta os resultados obtidos para os teores de grupos sulfidril nas amostras de músculos de bijupirá.

Tabela 1 – Teor de grupos sulfidril (-SH) dos hidrolisados protéicos e frações peptídicas de músculo de bijupirá obtidos com Alcalase, Flavourzyme e Protamex (HPMA, HPMF e HPMP).

	μmol SH/g proteína		
	Integral	> 3 kDa	< 3 kDa
HPMA	4,64^{bb} ± 0,01	10,96^{ba} ± 0,90	4,56^{ab} ± 0,09
HPMF	10,14^{ab} ± 0,45	25,83^{aa} ± 1,00	2,77^{bc} ± 0,06
HPMP	4,95^{ba} ± 0,81	4,86^{ca} ± 0,14	1,29^{cb} ± 0,07

Fonte: Os autores

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as amostras através do teste de Tukey ($p < 0,05$; $n=3$).

Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre as amostras através do teste de Tukey ($p < 0,05$; $n=3$).

Os hidrolisados apresentaram resultados bem distintos, sendo perceptível que, para uma mesma amostra (HPMF, por exemplo), a maior quantidade de grupos -SH estava presente geralmente nas frações maiores que 3 kDa, o que pode ser explicado pela maior dificuldade de transformação das proteínas a peptídeos e aminoácidos menores que 3 kDa.

Silva (2014), ao analisar o teor de grupos sulfidril de hidrolisados de isolado proteico e ossos desmineralizados de corvina com as mesmas enzimas deste trabalho, em frações maiores e menores que 3 kDa, encontrou que a enzima Protamex forneceu resultados superiores que as demais enzimas, seguidos da Flavourzyme e Alcalase. No entanto, ao trabalhar-se com músculo de pescado, percebe-se uma maior dificuldade na atuação desta enzima, já que as maiores atividades de liberação de aminoácidos e peptídeos contendo grupos sulfidril foi verificada pela enzima Flavourzyme.

Borges-Santos diz que não há valor de recomendação diária de ingestão para a cisteína, mas que a deficiência desta está diretamente ligada à menores defesas antioxidante e imunológica, com isso, além de agir como possível antioxidante dentro do alimento, a cisteína poderia ainda ser aproveitada para o consumo humano com muitos benefícios, como o citado por Sarmadi e Ismail, que dizem que os grupos -SH também atuam como sequestradores de radicais, protegendo os tecidos contra o estresse oxidativo.

4. CONCLUSÃO

A amostra que apresentou melhor resultado foi o hidrolisado proteico de músculo de bijupirá obtido com Flavourzyme, maior que 3 kDa, que apresentou um valor de 25,83 μmol de grupos sulfidril por grama de proteína, identificando possibilidade de maior potencial antioxidante e valor nutricional agregado.

5. AGRADECIMENTOS

À CAPES, ao CNPq e à FURG pelo apoio financeiro para o desenvolvimento e apresentação da presente pesquisa.

6. REFERÊNCIAS

- ADLER-NISSEN, J. Enzymatic hydrolysis of food proteins. **Elsevier Applied Science Publishing**, London, 1986
- BEVERIDGE, T.; JONES, L.; TUNG, M. A. Progel and gel formation and reversibility of gelation of whey, soybean, and albumen protein gels. **J. Agric. Food Chem.**, v. 32, p. 307-313, 1984.
- BORGES-SANTOS, M. D.; BURINI, R. C. Bases metabólicas da suplementação de cisteína. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 20, n. 4, p. 259-264, 2005.
- CARREIRA, R. L.; ORNELLAS, C. B. D.; MORAIS, H. A.; MOTTA, S.; SILVESTRE, M. P. C. Efeito da precipitação pelo ácido tricloroacético (TCA) e da ultrafiltração sobre o perfil peptídico de hidrolisado de caseína. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 2, p. 414-421, 2003.
- CENTENARO, G. S.; SALAS-MELLADO, M.; PIRES, C.; BATISTA, I.; NUNES, M. L.; PRENTICE C. Antioxidant Activity of Protein Hydrolysates of Fish and Chicken Bones. **Advance Journal of Food Science and Technology**, v. 3, n. 4, p. 280-288, 2011.
- FAO, 2009. Fishstat plus Vers. 2.3.2000: Universal software for fishery statistical time series: Aquaculture production 1950–2007; Capture production 1950–2007. FAO Fisheries and Aquaculture Department, Fishery Information, Data and Statistics Unit.
- GUÉRARD, F.; DECOURCELLE, N.; SABOURIN, C.; FLOCH-LAIZET, C.; LE GREL, L.; LE FLOCH, P.; GOURLAY, F.; LE DELEZIR, R.; JAOUEN, P.; BOURSEAU, P. Recent developments of marine ingredients for food and nutraceutical applications: a review. **Le Journal des Sciences Halieutique et Aquatique**, v. 2, p. 21-27, 2010.
- JUNG W., KARAWITA R., HEO S., LEE B., KIMA S., JEON Y., Recovery of a novel ca-binding peptide from Alaska Pollack (*Theragra chalcogramma*) backbone by pepsinolytic hydrolysis. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 2097–2100, 2006.
- KRISTINSSON, H. G.; RASCO, B. A. Fish protein hydrolysates: production, biochemical and functional properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 40, n. 1, p. 43-81, 2000.
- LIAO, I. C.; LEAÑO, E. M.; HSU, C. Y.; KU, C. C. Marine cage culture of in Taiwan. Cobia aquaculture: research, development and commercial production. **AFS, WAS, FST, NTOU**, Taiwan, p. 131–145, 2007.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265–275, 1951.

- OESTERLING, M. Cultured cobia satisfy tastebuds. **Virginia Marine Resources Bulletin**, v. 33, n. 2, p. 23, 2001.
- OETTERER, M. **Apostila de Tecnologia do Pescado**. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. USO, 1996.
- RAMALHO, V. C.; JORGE, N.; Antioxidants used in oils, fats and fatty foods. **Química Nova**, v.29, no.4, p. 755-760, 2006.
- SANTOS S. D.; GUIMARÃES V. M.; SALAS-MELLADO M. E PRENTICE C., Evaluation of functional properties in protein hydrolysates from Bluewing searobin (*Prionotus punctatus*) obtained with different microbial enzymes. **Food Bioprocess Technology**, v. 4, p. 1399–1406, 2009.
- SARMADI, B. H.; ISMAIL, A. Antioxidative peptides from food proteins: a review. **Peptides**, v. 31, p. 1949-1956, 2010.
- SHIMADA, K.; CHEFTEL, J. C. Sulfhydryl group/disulfide bond interchange reactions during heat-induced gelation of whey protein isolate. *J. Agric. Food Chem.*, v. 37, p. 161-168, 1989.
- SIGMA QUALITY CONTROL TEST PROCEDURE, product information, SSCASE01.001, 1999.
- SILVA, C. M. **Atividade antioxidante e antimicrobiana apresentada por peptídeos obtidos de subprodutos da corvina (*Micropogonias furnieri*)**. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de alimentos). Escola de Química e Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2014.
- WU, G.; FANG, Y.; YANG, S.; LUPTON, J. R.; TURNER, N. D. Glutathione metabolism and its implications for health. **Journal of Nutrition**, v. 134, n. 3, p. 489-492, 2004.