
Bioactivity of hydrolysates obtained from buffalo caseinate using macambira (*Bromelia laciniosa* L.) proteases

Bioatividade de hidrolisados obtidos a partir de caseinato bubalino utilizando proteases de macambira (*Bromelia laciniosa* L.)

Received: 15-06-2024 | Accepted: 19-07-2024 | Published: 23-07-2024

Dafné José Neri da Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0792-7768>

Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

Email: djnsacademico.dafne@gmail.com

Izaqueu Rodrigues da Silva

ORCID: <http://lattes.cnpq.br/0541002157666667>

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco, Brasil

E-mail: zaqueurs222@hotmail.com

José Vinicius Perminio Barbosa

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1399-9373>

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

E-mail: jose.vinicius.barbosa85@gmail.com

Wellington Leal dos Santos

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6257-7743>

Centro Universitário Maurício de Nassau, Brasil

E-mail: wellingtonleal16@gmail.com

Tonny Cley Campos Leite

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8779-8531>

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco, Brasil

E-mail: tonny.leite@barreiros.ifpe.edu.br

Keila Aparecida Moreira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7715-9285>

Universidade Federal do Agreste de Pernambuco, Brasil

E-mail: keila.moreira@ufape.edu.br

Amanda Reges de Sena

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1229-9543>

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco, Brasil

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

E-mail: amandareges@barreiros.ifpe.edu.br

ABSTRACT

Bromelain refers to a set of proteases with the ability to break peptide bonds, presenting several industrial applications. The present work aimed to obtain and evaluate protein hydrolysates from buffalo casein after the action of bromelain extracted from macambira (*Bromelia laciniosa*). Proteolytic activity was determined using azocasein as substrate. Total protein was determined using the Lowry method. The enzyme extract was partially purified and protein hydrolysates were obtained from buffalo caseinate through experimental design. It was found that bromelain promoted hydrolysis that varied between 14.47 and 19.43% and only the caseinate concentration was significant in the experimental field studied. All hydrolysates showed antioxidant activity by two methods used. The hydrolysates obtained did not show antimicrobial activity against the microorganisms tested. The bromelain obtained has the potential to obtain protein hydrolysates, with antioxidant activity, which can, after further studies, be added to functional foods.

Keywords: Antioxidant activity; Bromelain; Casein; Phytoprotease.

RESUMO

Bromelina refere-se a um conjunto de proteases com a capacidade de romper as ligações peptídicas, apresentando diversas aplicações industriais. O presente trabalho objetivou obter e avaliar hidrolisados proteicos a partir de caseína bubalina após ação de bromelina extraída de macambira (*Bromelia laciniosa*). A atividade proteolítica foi determinada utilizando azocaseína como substrato. A proteína total foi determinada pelo método de Lowry. O extrato enzimático foi parcialmente purificado e os hidrolisados proteicos foram obtidos a partir do caseinato bubalino por meio de planejamento experimental. Verificou-se que a bromelina promoveu hidrólises que variaram entre 14,47 a 19,43% e somente a concentração do caseinato foi significativa no campo experimental estudado. Todos os hidrolisados apresentaram atividade antioxidante por dois métodos empregados. Os hidrolisados obtidos não apresentaram atividade antimicrobiana frente aos micro-organismos testados. A bromelina obtida possui potencial para a obtenção de hidrolisados proteicos, com atividade antioxidante, onde estes podem, após estudos mais aprofundados, ser adicionados em alimentos funcionais.

Palavras-chave: Atividade antioxidante; Bromelina; Caseína; Fitoprotease.

INTRODUÇÃO

A macambira (*Bromelia laciniosa* Mart. Schult & Schult. f.) (Figura 1) é uma espécie vegetal pertencente à família *Bromeliaceae* sendo encontrada na caatinga do nordeste brasileiro. É uma espécie que pouco se tem referências, apesar de ser vista como uma das alternativas, oferecidas pela caatinga, para pequenos criadores do Nordeste como complementação alimentar de suas criações (caprinos, ovinos e suínos), e assim durante o período de estiagem reduzir custos, através de um manejo adequado e sustentável (Manetti *et al.*, 2009).

Figura 1. *Bromelia laciniosa* Mart. Ex Shult & Schult. f



Fonte: Os autores, 2024.

A macambira faz parte da mesma família do abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Merrill) e possui em suas partes um complexo de enzimas nomeadas de bromelina. Essa protease possui diversas propriedades notáveis relatadas na literatura, inclusive na área alimentícia (Almeida *et al.*, 2022; Silva *et al.*, 2022).

A Bromelina é uma enzima proteolítica da classe das hidrolases sendo responsáveis por romper a ligação peptídica das proteínas e peptídeos. A especificidade das proteases é ampla e classificada de acordo com a constituição de seu sítio ativo em três grupos principais: serina protease, ácido aspártico protease e cisteína protease, sendo que a bromelina se enquadra neste último grupo (Santos, 1995). O biocatalisador é encontrado em diferentes espécies vegetais da família *Bromeliaceae*, como citado anteriormente, sendo encontrada em seus tecidos, incluindo talo, fruto e folhas, onde o abacaxi (*Ananas comosus*) é o representante mais conhecido (Gupta, 2003; Maurer, 1999).

As enzimas proteolíticas são consideradas ferramentas importantes para a obtenção de hidrolisados proteicos, os quais são fragmentos específicos de proteínas que apresentam impacto positivo sobre funções fisiológicas, podendo influenciar benéficamente a saúde (Kitts; Weiler, 2003; Tavano, 2013). Os substratos incluem muitas proteínas que têm características comuns, tais como caseína, gelatina, colágeno, globulinas e fibra muscular, o que torna as proteases como promissoras de aplicações biotecnológicas. Diversos estudos têm reportado a produção de peptídeos e hidrolisados proteicos originados de proteínas do leite.

Basicamente, a rota mais comum para a produção de peptídeos que apresentem atividade biológica é através da hidrólise de proteínas por processos digestivos ou por fermentação microbiana, mas processos enzimáticos *in vitro* são amplamente estudados (Agyei; Danquar, 2011; Hernández-Ledesma *et al.*, 2011) e a utilização de enzimas proteolíticas derivadas de plantas têm sido empregadas com sucesso na produção dessas moléculas (Phelan *et al.*, 2009). Vale ressaltar que a hidrólise enzimática possui algumas vantagens, a saber: atuam em condições brandas de pH, temperatura, alta especificidade,

não gera subprodutos, aumento da qualidade do produto obtido e a redução dos custos laboratoriais e de maquinário, oferecendo assim produtos diferenciados na indústria alimentícia (Ahmad *et al.*, 2022; Mussatto *et al.*, 2007; Nasrabadi *et al.*, 2021).

Os hidrolisados enzimáticos são, compreensivelmente, produtos de grande interesse para a indústria e para a saúde humana devido às suas propriedades funcionais, nutricionais e bioativas que auxiliam na prevenção e tratamento de diversas doenças, bem como na melhoria da qualidade de vida (BIASUTTI *et al.*, 2008).

Segundo Korhonen (2009) as proteínas do leite são consideradas a mais importante fonte de peptídeos bioativos. As caseínas são os principais componentes proteicos do leite (80%) e a partir de sua hidrólise uma gama de peptídeos com atividade biológica é liberada, como peptídeos antimicrobianos (Kalyan *et al.*, 2021) e antioxidantes (Nascimento *et al.*, 2021).

Neste sentido, verifica-se que a busca de novas fontes de bromelina é atual e interessante uma vez que ela pode ter potencial para a produção de hidrolisados de proteína. A partir do exposto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial de bromelina, extraída de folhas da macambira, em produzir hidrolisados proteicos com atividade biológica.

MATERIAL E MÉTODOS

A macambira (*Bromelia laciniosa* Mart. Ex Shult & Schult. f.) foi coletada em Serra Talhada, Pernambuco. As folhas foram separadas manualmente, lavadas e cortadas em pequenos pedaços. As folhas inteiras foram destinadas a produção da exsicata e identificação botânica, sendo depositada no herbário da UFPE sob a numeração de 81.238. Os projetos estão cadastrados junto ao Sisgen com as numerações AF85CB e A7469D4.

Obtenção da bromelina

A bromelina foi extraída por meio de trituração com tampão fosfato de sódio (0,2 M), pH 7,0 na proporção de 1:1 (p/v) em processador industrial. Após a trituração, o extrato obtido foi filtrado em papel filtro qualitativo e em seguida levado para a centrífuga refrigerada (Heraeus Multifuge X1R Datamed®), com a seguinte programação: 4°C a

10000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante, considerado extrato enzimático bruto, foi armazenado sob congelamento à -20°C.

Precipitação com etanol

Para a realização da precipitação fracionada com etanol seguiu-se a metodologia de England e Seifert (1990) com modificações. O solvente foi arrefecido a uma temperatura de 0°C e em seguida adicionado gota a gota ao extrato enzimático bruto até a concentração desejada do mesmo (70%, v/v). A mistura permaneceu em contato por 1 hora em temperatura de 10°C antes de ser centrifugada a 10000 rpm por 20 minutos (4°C). O precipitado foi ressuspendido, em tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,0, no mesmo volume de extrato adicionado durante o processo de precipitação. Os precipitados ressuspendidos foram liofilizados de acordo com os procedimentos informados no manual do fabricante do Liofilizador (L101, Liotop®) e estocados em freezer a -20°C para análises posteriores.

Atividade proteolítica

A atividade proteolítica foi verificada utilizando a azocaseína (SIGMA®) como substrato, segundo a metodologia proposta por Silva *et al.* (2022). Os ensaios realizados foram compostos por 0,25 mL de azocaseína 0,5% (p/v) dissolvida em tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,0 e 0,25 mL do extrato enzimático, onde foram incubados a 47°C por 40 minutos. A reação foi interrompida após a adição de 0,25 mL do ácido tricloroacético (TCA) 10% (p/v) e em seguida realizada a centrifugação a 5500 rpm por 20 minutos à 4°C. Após centrifugação uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante reagiu com 0,5 mL de hidróxido de potássio (0,5 M) e posteriormente realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 430 nm. Brancos das amostras também foram considerados no experimento. Definiu-se uma unidade de protease como a quantidade de enzima capaz de produzir um aumento na absorbância de 0,001 por 40 minutos de reação a 47°C a leitura de absorbância a 430 nm. Todos os testes foram realizados em triplicata e repetidos duas vezes.

Determinação proteica

Determinou-se a proteína total pelo método proposto por Lowry (1951), utilizando a albumina de soro bovino como padrão. Todos os testes foram realizados em triplicata e repetidos duas vezes.

Obtenção e hidrólise do caseinato bubalino

Obteve-se a caseína bubalina através de parceria com a Universidade Federal do Agreste de Pernambuco (UFAPE). Para a obtenção dos hidrolisados dissolveu-se o caseinato sódico liofilizado em tampão fosfato de sódio (0,02 M, pH 7). Incubou-se o caseinato sódico com a bromelina parcialmente purificada, a 47°C, em diferentes condições de hidrólise obtidas por meio da utilização do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), onde foram estudadas 3 variáveis independentes (tempo de hidrólise, concentração do caseinato sódico e relação enzima-substrato), em cinco níveis totalizando em 17 ensaios (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1. Valores reais e codificados do DCCR para a hidrólise do caseinato bubalino

Variáveis	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Caseinato sódico (%)	1,2	1,5	2	2,5	2,8
E:S	1:58	1:75	1:100	1:125	1:142
Tempo de hidrólise (min)	59	120	210	300	361

Tabela 2: DCCR para a hidrólise do caseinato bubalino

Ensaio	Caseinato	[E:S]	Tempo
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
9	-1,68	0	0
10	+1,68	0	0
11	0	-1,68	0
12	0	+1,68	0
13	0	0	-1,68
14	0	0	+1,68
15 (C)	0	0	0
16 (C)	0	0	0
17 (C)	0	0	0

E:S: relação enzima:substrato; C: ponto central

Em todos os testes, a reação foi interrompida com aquecimento das amostras a 100°C por 10 minutos. Em seguida, todo o material foi liofilizado para análises posteriores.

Determinação do grau de hidrólise dos hidrolisados do caseinato bubalino

O grau de hidrólise (GH) foi considerado como o percentual de ligações peptídicas clivadas, o qual foi determinado por meio da quantificação de grupos amino livres com 2,4,6-ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS), de acordo com a metodologia descrita por Adler-Nissen (1979), com algumas modificações. O número total de grupos amina foi determinado numa amostra de proteína do caseinato sódico (16 mg) completamente hidrolisado por 4 mL de HCl (6 M), durante 12 h a 100°C. O GH foi calculado segundo

a expressão: $\text{GH (\%)} = h \text{ (n}^\circ \text{ de ligações peptídicas clivadas)} / H \text{ total (n}^\circ \text{ total de ligações peptídicas)}$.

Atividade biológica dos hidrolisados do caseinato bubalino

Atividade antioxidante

Atividade sequestradora do radical DPPH

Para análise de atividade antioxidante total (Brand-Williams *et al.*, 1995) foram pipetados em tubos de ensaio 50 μL dos hidrolisados e 1,95 mL de DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil) a 60 μM (diluído em etanol). Os tubos foram agitados e postos para reagir por 20 minutos ao abrigo da luz. Um controle negativo foi utilizado, trocando-se a amostra por etanol. Decorrido o tempo, foram medidas as absorvâncias das amostras a 515 nm. A capacidade de sequestro de radical DPPH foi calculada de acordo com a seguinte equação: $\text{Atividade antioxidante (\%)} = [(A_0 - A_1) / A_0] * 100$. Onde A_0 correspondeu à absorvância do controle negativo e A_1 a absorvância das amostras.

Atividade sequestradora do radical ABTS

A atividade sequestradora do radical ABTS dos hidrolisados foi determinada de acordo com metodologia proposta por Re *et al.* (1999), com modificações. Para a reação, 50 μL das amostras foram misturados com 950 μL da solução do radical ABTS. Como controle negativo foi utilizado álcool etílico no lugar das amostras. Os ensaios foram incubados por seis minutos e lidos a 734 nm. A atividade antioxidante foi calculada em relação à atividade de eliminação do radical (%), de acordo com a seguinte equação: $\text{Atividade antioxidante (\%)} = [(A_0 - A_1) / A_0] * 100$. Onde A_0 correspondeu à absorvância do controle negativo e A_1 a absorvância das amostras.

Determinação do poder redutor

A atividade antioxidante foi determinada através do poder redutor segundo o método de Waterman e Mole (1994). A 100 μL das amostras foram adicionados 8,5 mL de água destilada. Logo em seguida, foi adicionado 1,0 mL da solução de FeCl_3 (0,1 M) e após 3 min, 1,0 mL de ferricianeto de potássio (0,08 M). Após 15 min foi realizada a leitura da absorvância a 720 nm. O branco foi preparado com uma solução conforme o

procedimento acima, sem a utilização da amostra. Os dados foram calculados por meio de uma curva de calibração utilizando ácido ascórbico (31,25 - 500 mg/mL) e os resultados foram expressos em mg de ácido ascórbico por mL de hidrolisados (mg de EAC/mL de hidrolisados).

Atividade antibacteriana

As linhagens de bactérias utilizadas foram obtidas a partir da Coleção de Micro-organismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPEDA): *Staphylococcus aureus* (UFPEDA 01 – Gram positiva), *Escherichia coli* (UFPEDA 224 – Gram negativa) e *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 39 – Gram negativa).

A determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) foi realizada pela metodologia da microdiluição em caldo segundo o Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) (CLSI, 2018). A determinação da concentração inibitória mínima foi realizada utilizando placas com 96 poços estéreis, próprias para microdiluição.

Inicialmente foram adicionados em cada poço 90 µL do meio Caldo Muller Hinton (CMH) e a partir da terceira coluna, 90 µL do hidrolisado (8 mg/mL). Esta alíquota foi homogeneizada e transferida para a quarta coluna (A₄) e assim por diante até a décima segunda coluna (A₁₂), estando o hidrolisado na concentração de 0,03 mg/mL. Por último, foi adicionada uma alíquota de 10 µL da suspensão do micro-organismo na concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. As placas foram incubadas por 24 horas a 37 °C. Posteriormente foram adicionados 30 µL de rezasurina (0,1 mg/mL) seguida de incubação por 3 a 5 horas até a mudança de coloração, onde esta indica se houve crescimento microbiano (rosa) ou não (azul).

Análise estatística

Após obtenção dos resultados, os mesmos foram analisados através do programa SISVAR – Sistema de Análise de Variância (Ferreira, 2011), realizando-se a comparação de médias pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5 % de probabilidade. Ademais, uma Análise de Variância (ANOVA) através do programa Statistica 10.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, USA), foi feita para indicar as variáveis com efeitos estatisticamente significativos

($p < 0,05$) e o ajuste do modelo aos dados experimentais. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atividade enzimática

A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos com o extrato enzimático bruto (EB) e o precipitado 70% (v/v).

Tabela 3. Resultados da purificação parcial da bromelina

	AV	PT	AE	FP	RENDIMENTO
	U/mL	mg/mL	U/mg		%
EB	5,18	0,88	5,89	1,00 b	100
70%	5,18	0,22	23,96	4,07 a	100

AV – Atividade Volumétrica; PT – Proteína total; AE – Atividade Específica; FP – Fator de Purificação.

Soares *et al.* (2012) ao avaliarem o processo de purificação de bromelina de resíduos do abacaxi utilizando etanol, verificaram um maior fator de purificação (2,28) e rendimento (98%) ao utilizar 30% da enzima. Já Costa *et al.* (2014) ao avaliar a purificação de bromelina obtida também dos resíduos do abacaxi obtiveram fatores de purificação em torno de 3,01 para cromatografia de troca iônica e 16,96 para cromatografia de filtração em gel.

Após o processo de purificação parcial a bromelina foi utilizada na hidrólise das caseínas do leite bubalino por meio do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) sendo este de suma importância para avaliar os fatores que realmente influenciaram a hidrólise da caseína.

Produção de hidrolisados proteicos de caseinato bubalino

Este é o primeiro trabalho que relata a hidrólise da caseína de leite bubalino utilizando bromelina obtida das folhas da macambira. Na Tabela 4 são apresentados os resultados obtidos na hidrólise. Como pode ser observado, houve uma variação no grau

de hidrólise entre 14,47 e 19,43%, o que indica a importância da otimização da hidrólise para atingir rendimentos mais elevados.

Tabela 4. Grau de hidrólise dos hidrolisados obtidos pela ação da bromelina parcialmente purificada sobre a caseína do leite bubalino

Ensaio	Grau de hidrólise (%)
1	16,40 ± 0,040
2	19,033 ± 0,050
3	15,00 ± 0,042
4	18,57 ± 0,031
5	15,63 ± 0,068
6	18,70 ± 0,052
7	15,80 ± 0,022
8	18,90 ± 0,042
9	14,47 ± 0,076
10	18,33 ± 0,025
11	17,43 ± 0,012
12	17,63 ± 0,0070
13	18,067 ± 0,021
14	17,53 ± 0,00
15 (C)	18,53 ± 0,028
16 (C)	18,83 ± 0,042
17 (C)	19,43 ± 0,011

C: ponto central

Silva *et al.* (2009) avaliaram a hidrólise de concentrado proteico do soro de leite utilizando proteases comerciais de diferentes fontes de origem (vegetal, bacteriana e fúngica). Observou-se que o grau de hidrólise apresentou uma ampla faixa de valores, indo de 2,5% para o hidrolisado preparado com a protease do *Aspergillus sojae* a 30% para o hidrolisado preparado com a pancreatina. A papaína proporcionou um grau de hidrólise em torno de 15%. Lira *et al.* (2010) avaliaram o grau de hidrólise enzimática (papaína, tripsina e pepsina) de caseína do leite de cabra Moxotó utilizando planejamento fatorial completo (2⁴). Após as avaliações os autores encontraram os seguintes resultados: variou entre 12,96 e 26,91% utilizando a tripsina, 4,98 e 37,57 utilizando a pepsina e 9,11

e 28,17% utilizando a papaína. Verifica-se, então, que os resultados supracitados corroboram com os resultados obtidos neste trabalho.

Os resultados indicaram que somente a concentração do caseinato em seus termos linear e quadrático foram estatisticamente significativos ao nível de confiança e campo experimental estudados.

O teste de Fisher indicou que a equação ajustada foi estatisticamente significativa ($F_{cal} > F_{tab}$) e a falta de ajuste indicou uma boa concordância ($F_{cal} < F_{tab}$) entre o modelo ajustado e os dados experimentais para cada variável (Tabela 5). A qualidade do ajuste também foi confirmada pelo coeficiente de determinação ($R^2 = 0,96$) o qual implica que somente 4 % da variabilidade da resposta não foi explicada pelo modelo. O modelo citado para o grau de hidrólise (GH) (Eq. (1)) pode ser utilizado para prever o grau de hidrólise da caseína bubalina dentro do campo experimental estudado.

Tabela 5. Análise de variância para os resultados do grau de hidrólise

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	Fcal	Ftab
Regressão	36,09	9	4,01	20,05*	3,68
Resíduo	1,38	7	0,20		
Falta de ajuste	0,96	5	0,19	0,90	19,30
Puro erro	0,42	2	0,21		
Total	37,47				

*Estatisticamente significativa. Fcal – F calculado; Ftab – F tabelado (Nível de confiança: 95 %). $R^2 = 0,96$.

$$GH = 18,92 + 1,38 * C - 0,87 * C^2 - 0,085 * E:S - 0,47 * E:S^2 - 0,064 * T - 0,37 * T^2 + 0,12 * C * E:S - 0,0041 * C * T + 0,27 * E:S * T \quad (\text{Eq. (1)})$$

Onde: C é a concentração de caseinato bubalino, E:S é a relação enzima e substrato e T o tempo de hidrólise.

As figuras obtidas (Figuras 2, 3 e 4) mostram as superfícies de respostas tridimensionais para o grau de hidrólise. O objetivo principal das superfícies é buscar com eficiência os valores ótimos das variáveis de tal forma que a resposta seja maximizada (Kumar *et al.*, 2014). No campo experimental estudado verifica-se que a melhor condição para a obtenção de um maior grau de

hidrólise encontra-se no ponto central (2% de caseinato bubalino, 1:100 para relação enzima:substrato e 210 minutos de hidrólise).

Figura 2. Superfície de resposta e curvas de contorno para o grau de hidrólise da caseína bubalina considerando a interação entre a concentração do caseinato e relação enzima:substrato

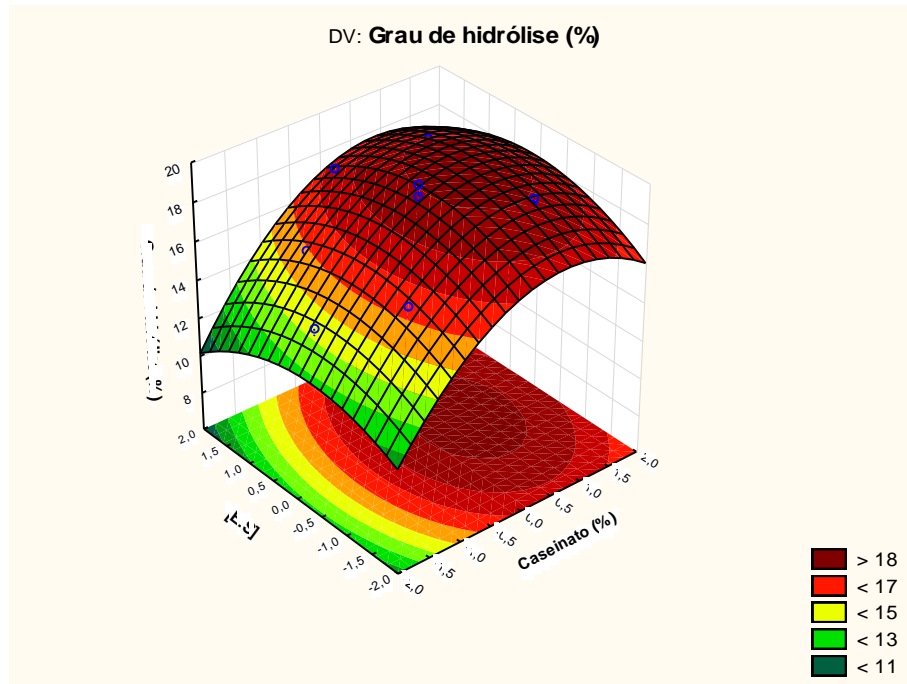


Figura 3. Superfície de resposta e curvas de contorno para o grau de hidrólise da caseína bubalina considerando a interação entre a concentração do caseinato e tempo de hidrólise

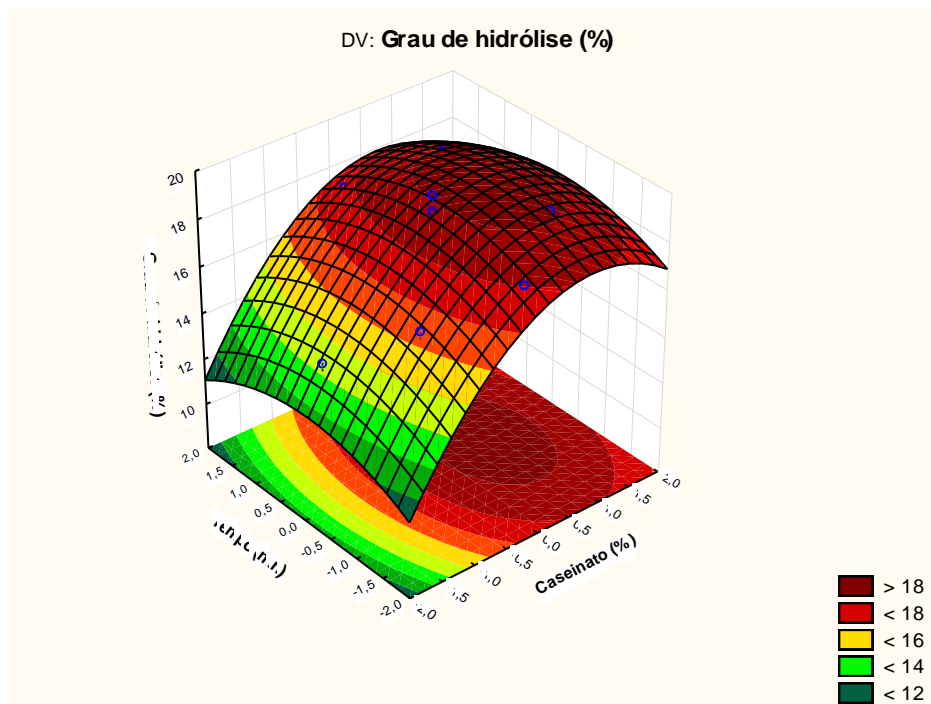
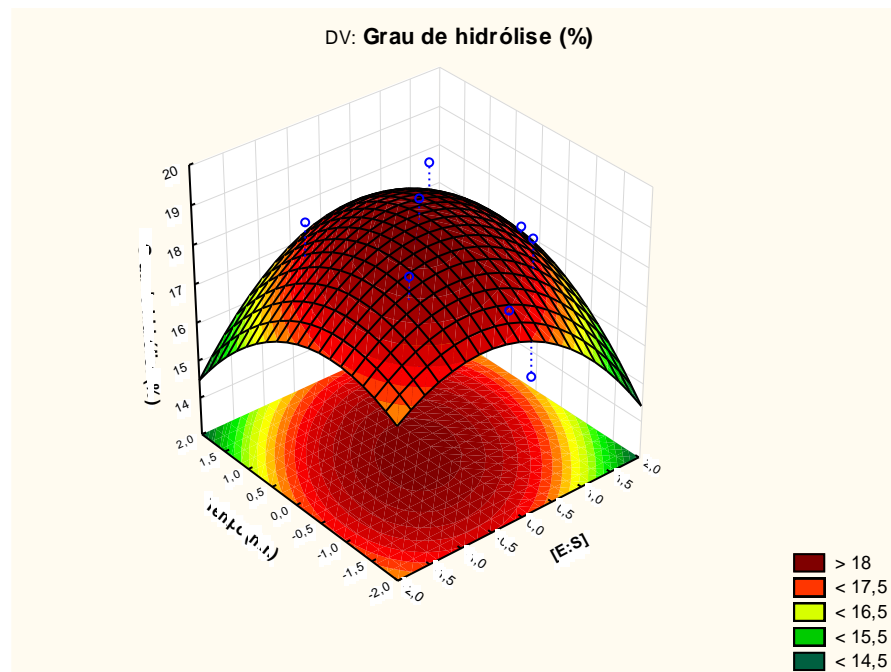


Figura 4. Superfície de resposta e curvas de contorno para o grau de hidrólise da caseína bubalina considerando a interação entre o tempo de hidrólise e relação enzima:substrato



Avaliação da atividade biológica

Atividade antioxidante

Os resultados para a atividade antioxidante estão dispostos na Tabela 6. Foram realizados três métodos. Os hidrolisados apresentaram atividade antioxidante pelos métodos do radical ABTS e poder redutor. Pela eliminação do radical ABTS os resultados variaram entre 73,88 a 88,49% e no poder redutor, entre 0,043 a 0,099 μg EAA/mL da amostra. Os diferentes valores obtidos para os hidrolisados podem ser devido à diferença entre os perfis peptídicos formados em cada condição de ensaio.

Tabela 6. Eliminação dos radicais ABTS, DPPH (%) e poder redutor dos hidrolisados obtidos pela ação de bromelina, extraída da macambira, sobre a caseína de leite bubalino

Ensaio	Atividade antioxidante –	Atividade antioxidante –	Atividade antioxidante –
	ABTS•+ (%)	DPPH• (%)	Poder redutor (µg EAA/mL amostra)
1	78,69 ± 0,001	0,00 ± 0,00	0,086 ± 0,02
2	84,54 ± 0,002	0,00 ± 0,00	0,075 ± 0,04
3	83,16 ± 0,03	0,00 ± 0,00	0,074 ± 0,006
4	82,13 ± 0,001	0,00 ± 0,00	0,080 ± 0,004
5	78,69 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,083 ± 0,001
6	87,29 ± 0,003	0,00 ± 0,00	0,077 ± 0,007
7	73,88 ± 0,002	0,00 ± 0,00	0,076 ± 0,006
8	83,33 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,089 ± 0,001
9	87,97 ± 0,004	0,00 ± 0,00	0,090 ± 0,004
10	84,54 ± 0,002	0,00 ± 0,00	0,093 ± 0,006
11	88,32 ± 0,002	0,00 ± 0,00	0,071 ± 0,02
12	84,021 ± 0,004	0,00 ± 0,00	0,084 ± 0,01
13	86,60 ± 0,001	0,00 ± 0,00	0,060 ± 0,006
14	86,94 ± 0,001	0,00 ± 0,00	0,043 ± 0,01
15 (C)	77,55 ± 0,011	0,00 ± 0,00	0,085 ± 0,001
16 (C)	83,85 ± 0,001	0,00 ± 0,00	0,099 ± 0,001
17 (C)	88,49 ± 0,002	0,00 ± 0,00	0,097 ± 0,007

Médias seguidas por letras distintas na vertical diferem entre si ao nível de 5 % de probabilidade pelo Teste de Tukey. C: Ponto central. EAA: Equivalente em ácido ascórbico.

A não capacidade de eliminação do DPPH• pode ter sido resultado da baixa solubilidade das soluções aquosas dos hidrolisados. Segundo Prado (2009) o método de sequestro do radical livre DPPH pode ser utilizado para avaliar a atividade antioxidante de compostos específicos ou de um extrato. Já a metodologia de ABTS•+ pode-se medir atividade de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica (Kuskoski *et al.*, 2005). Verifica-se então que cada método possui sua especificidade e o hidrolisado produzido apresenta um comportamento diferente frente a cada ensaio adotado. É possível também um mesmo hidrolisado apresentar potenciais antioxidantes diferentes dependendo do

método de avaliação empregado e por isso a importância de se realizar mais de um método de avaliação (Esperança, 2019).

Nascimento *et al.* (2021) avaliaram, *in vitro*, a bioatividade de hidrolisados obtidos de caseinato bovino e caprino. Os autores obtiveram os hidrolisados após ação de protease excretada por *Acremonium* sp. L1-4B. Os hidrolisados de caseinato bovino e caprino apresentaram capacidade de capturar o radical ABTS. As amostras de origem caprina apresentaram valores entre 22,5 a 67,5% e as amostras bovinas entre 11,6 e 65,2%. Já em relação à eliminação do radical DPPH, os hidrolisados de caseinato caprino apresentaram valores entre 10,7 a 11,8%. As amostras derivadas do caseinato bovino também não mostraram habilidade em eliminar o radical DPPH. Santos *et al.* (2020) avaliaram a atividade antioxidante de hidrolisados proteicos de caseinato de búfalo. Os autores aplicaram enzimas comerciais e entre elas a bromelina. A aplicação perdurou por 4 h. Após utilizar a bromelina, os hidrolisados obtidos apresentaram capacidade de eliminação dos radicais DPPH e ABTS em torno de 56,85 e 84,19%, respectivamente. Em trabalho desenvolvido por Santos *et al.* (2021), os autores verificaram o poder antioxidante de hidrolisados de caseinato bubalino onde os mesmos apresentaram eliminação do radical DPPH variando entre 16 a 28,70% e ABTS•⁺ entre 1,62 a 99,40%.

Vale destacar que as propriedades antioxidantes dos hidrolisados estão diretamente relacionadas com a sua composição de aminoácidos, estrutura e hidrofobicidade (CHEN *et al.*, 1998). Neste sentido, a hidrólise enzimática sob condições controladas é uma forma eficaz de aperfeiçoar as propriedades funcionais dessas moléculas sem afetar seu valor nutricional.

Atividade antibacteriana

Foram avaliadas três bactérias: *Staphylococcus aureus* (UFPEDA 01 – Gram positiva), *Escherichia coli* (UFPEDA 224 – Gram negativa) e *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 39 – Gram negativa). Não foi verificada atividade antibacteriana das amostras contra as cepas bacterianas estudadas. Provavelmente não foi possível verificar atividade devido ao maior tamanho dos hidrolisados, o que dificultou a passagem dos mesmos pela membrana celular. É sabido que bactérias Gram negativas possuem o envelope celular com arranjo mais complexo do que as Gram positivas, entretanto, pouco se sabe sobre composição, aparatos e formas de atuação dos hidrolisados, de modo que, muitas características precisam ser analisadas, desde a massa molecular, o arranjo de

aminoácidos na sequência e até mesmo a espécie bacteriana experimentada (Lima *et al.*, 2015).

CONCLUSÃO

Este é o primeiro trabalho que relata a hidrólise do caseinato bubalino utilizando bromelina extraída de folhas da macambira. A bromelina foi capaz de produzir hidrolisados proteicos com diferentes propriedades antioxidantes. O estudo sugere que os produtos obtidos, após estudos mais aprofundados, podem ser aplicados como antioxidantes naturais em alimentos.

Ademais, conclui-se que a obtenção de hidrolisados proteicos a partir de proteases da macambira pode aumentar o valor agregado e usos deste vegetal encontrado na caatinga, contribuindo desta forma para a melhoria da qualidade de vida do pequeno agricultor.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco pelas bolsas concedidas e o auxílio financeiro (Edital nº 10/2019/Propesq - Concessão de Bolsas e Auxílios a Pesquisadores do IFPE).

REFERÊNCIAS

ADLER-NISSEN, J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 27, p. 1256-1262, 1979. DOI: 10.1021/jf60226a042.

AGYEI, D.; DANQUAH, M. K. Industrial-scale manufacturing of pharmaceutical-grade bioactive peptides. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 272-277, 2011. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2011.01.001.

AHMAD, M. et al. Plant-based meat alternatives: Compositional analysis, current development and challenges. **Applied Food Research**, v. 2, 100154, 2022. DOI:10.1016/j.afres.2022.100154.

ALMEIDA, A.S.B. et al. **Aplicação de bromelina extraída da macambira e seu efeito no amaciamento de braço bovino**. *In*: Ciências Biológicas e Suas Multiplicas

Aplicabilidades. Lucena Rocha Virgilio (org.). – Rio Branco: Stricto Sensu, 2022. DOI: 10.35170/ss.ed.9786586283785.06.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 28, p. 25-30, 1995. DOI: 10.1016/S0023-6438(95)80008-5.

CHEN et al. Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 46, n. 1, p. 49-53, 1998. DOI: 10.1021/jf970649w.

CHEN, M., E B. LI. The effect of molecular weights on the survivability of casein-derived antioxidant peptides after the simulated gastrointestinal digestion. **Innovative Food Science Emerging Technologies**, v.16, p. 341-448, 2012. DOI: 10.1016/j.ifset.2012.07.009.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; TwentyEight Informational Supplement. CLSI document M100-S28. Wayne, Pa. CLSI, **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2018.

COSTA, H. B. et al. A new procedure based on column chromatography to purify bromelain by ion exchange plus gel filtration chromatographies. **Industrial Crops Products**, v. 59, p. 163-168, 2014.

DUTRA A. S.; TEÓFILO E. M.; MEDEIROS-FILHO S. Germinação de sementes de macambira (*Bromelia laciniosa* Mart. ex Schult). **Revista Caatinga**, v. 23, p. 12-17, 2010.

ENGLARD, S.; SEIFTER, S. **Precipitation techniques**. In: Guide to protein purification, Eds. DEUTSCHER, M.P. Academic Press, San Diego, USA, 1990. DOI: 10.1016/0076-6879(90)82024-V.

ESPERANÇA, V. J. R. **Obtenção e aplicação de hidrolisados proteicos antioxidantes provenientes da hidrólise enzimática de clara de ovo em pó**. Rio de Janeiro, (2019) 104p. (Dissertação de Mestrado em Alimentos e Nutrição).

FERREIRA, D. F. **Estatística multivariada**. 2. ed. Lavras: UFLA, 675 p, 2011.

KALYAN, S. et al. In vitro assessment of antioxidative potential of goat milk, casein and its hydrolysates: comparison of goat milk with bovine and buffalo milk. **Research Square**, v. 1, p. 1-19, 2021. DOI: 10.21203/rs.3.rs-546200/v1.

KITTS, D. D.; WEILER, K. Bioactive proteins and peptides from food sources: application of bioprocesses used in isolation and recovery. **Current Pharmaceutical Design**, v. 9, p. 1309 - 1323, 2003. DOI: 10.2174/1381612033454883.

KORHONEN, H. Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. **Journal of Functional Foods**, v. 1, p. 177-187, 2009. DOI:10.1016/j.jff.2009.01.007.

KUMAR, R. S.; ANANTHAN, G.; PRABHU, A. S. Optimization of medium composition for alkaline protease production by *Marinobacter* sp. GA CAS9 using response surface methodology – A statistical approach. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, p. 191-197, 2014. DOI: 10.1016/j.bcab.2013.11.005.

KUSKOSKI, E.M. et al. Aplicação de diversos métodos químicos para determinar atividade antioxidante em pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 726-732, 2005.

LIMA, C. A. et al. Antimicrobial and radical scavenging properties of bovine collagen hydrolysates produced by *Penicillium aurantiogriseum* URM 4622 collagenase. **Journal of Food Science and Technology**, v.52, p.4459-4466, 2015. DOI: 10.1007/s13197-014-1463-y.

LIRA, T. B. F. et al. Avaliação de variáveis que influenciam a hidrólise enzimática da caseína do leite de cabra Moxotó. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, p. 1036-1043, 2010.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-276, 1951.

MANETTI, L. et al. Metabólitos secundários da família Bromeliaceae. **Química Nova**, v. 32, p. 1885-1897, 2009. DOI: 10.1590/S0100-40422009000700035.

MUSSATTO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. F. Biotecnologia – enzimas ferramentas na indústria. **Ciência Hoje**, v. 41, p. 28-33, 2007.

NASCIMENTO, T. C. E. S. et al. Antarctic fungus proteases generate bioactive peptides from caseinate. **Food Research International**, v. 139, p. 10994.4, 2021. DOI: 10.1016/j.foodres.2020.109944

NASRABADI, M. N.; DOOST, A. S.; MEZZENGA, R. Modification approaches of plant-based proteins to improve their techno-functionality and use in food products. **Food Hydrocolloids**, v. 118, 106789, 2021. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2021.106789.

PHELAN, M. et al. Casein-derived bioactive peptides: Biological effects, industrial uses, safety aspects and regulatory status. **International Dairy Journal**, v. 19, p. 643-654, 2009. DOI: 10.1016/j.idairyj.2009.06.001.

PIHLANTO, A. 2006. Antioxidative peptides derived from milk proteins. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 1306-1314, 2006. DOI:10.1016/j.idairyj.2006.06.005.

PRADO, A. **Composição fenólica e atividade antioxidante de frutas tropicais**. Dissertação [Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos] - Universidade de São Paulo; 2009.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 1231–1237, 1999. DOI: 10.1016/s0891-5849(98)00315-3.

SANTOS, S. A. **Efeito do tempo na composição físico-química. Química e na atividade da bromelina do caule do abacaxizeiro *Ananas comosus* (L.) merr. cv. Pérola armazenado em condições com e sem refrigeração.** Lavras: ESAL, (1995) 47p. (Dissertação de mestrado em Ciência dos Alimentos).

SANTOS, W. L. et al. Potencial antioxidante de hidrolisados proteicos obtidos a partir de caseinato de ruminantes pela ação de proteases comerciais. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 20, p. 510-519, 2021. DOI: 10.9771/cmbio.v20i4.38748.

SANTOS, W. L. et al. Atividade antioxidante, inibição da enzima conversora de angiotensina I (ECA) e atividade antibacteriana de hidrolisados proteicos de caseinato de búfalo e suas frações. **Research, Society and Development**, v. 9, p. 1-25, 2020. DOI: 10.33448/rsd-v9i12.10772.

SILVA, D. et al. Biochemical Characteristics and Healing Activity of *Bromelia laciniosa* Leaf Protease. **Catalysis Research**, v. 2, p. 1-28, 2022. DOI:10.21926/cr.2203024.

SILVA, M. C. et al. Grau de hidrólise e perfil peptídico de hidrolisados enzimáticos obtidos a partir de concentrado proteico do soro de leite. **Alimentos e Nutrição**, v. 20, p. 395-402, 2009.

SOARES, P. A. G. et al. Purification of bromelain from pineapple wastes by ethanol precipitation. **Separation and Purification Technology**, v. 98, p. 389-395, 2012. DOI: 10.1016/j.seppur.2012.06.042.

SU, R. Et al. Pancreatic hydrolysis of bovine casein: Peptide release and time-dependent reaction behavior. **Food Chemistry**, v. 133, p. 851.–858, 2012. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.01.103

TAVANO, O. L. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. **Journal of Molecular Catalysis: B Enzymatic**, v. 90, p. 1-11, 2013. DOI:10.1016/j.molcatb.2013.01.011.

WATERMAN, P. G.; MOLE, S. **Analysis of phenolic plant metabolites.** Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 66-103, 1994.