



ESTUDO COMPARATIVO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM HIDROLISADOS PROTÉICOS DE PESCADO E DE FRANGO

CENTENARO, Graciela Salete¹; PIOTROWICZ, Inajara Beatriz¹; PRENTICE-HERNÁNDEZ, Carlos²

^{1,2} Universidade Federal do Rio Grande - Escola de Química e Alimentos – FURG
Campus Cidade – Caixa Postal 474 - CEP 96201-900. gracentenaro@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

A oxidação de lipídios é um processo indesejável, pois leva principalmente a mudanças na coloração e no sabor dos produtos. Para retardar as mudanças oxidativas indesejadas têm-se utilizado frequentemente, substâncias antioxidantes para auxiliar o processamento e preservação de alimentos (Suetsuna, 2000).

Das centenas de compostos que têm sido sugeridos para inibir a deterioração através das substâncias oxidáveis, somente alguns podem ser usados em produtos para consumo humano. Na seleção de antioxidantes, são desejáveis as seguintes propriedades: eficácia em baixas concentrações (0,001 a 0,01%); ausência de efeitos indesejáveis na cor, no odor, no sabor e em outras características; compatibilidade com o alimento; ser de fácil aplicação; estabilidade nas condições de processo e de armazenamento; sendo que o composto e seus produtos de oxidação não podem ser tóxicos, mesmo em doses muito maiores das que normalmente seriam ingeridas no alimento (Bailey, 1996).

Além das propriedades funcionais, tecnológicas e nutricionais, algumas proteínas podem apresentar atividade biológica, como por exemplo, atividade antioxidante, que pode estar associada aos peptídeos bioativos presentes em determinadas seqüências da proteína, liberados após a hidrólise enzimática (Costa, et al., 2007). Os peptídeos bioativos são cadeias seqüenciais de aminoácidos de pequeno tamanho, contendo entre dois e quinze resíduos, inativos dentro da proteína, mas que podem ser liberados, e exercer efeitos benéficos para o organismo (Vioque et al., 2006). Estes peptídeos podem ser úteis não só para a saúde do indivíduo, mas também como antioxidantes naturais para a conservação de alimentos. No entanto sua atividade irá depender da composição e seqüência de aminoácidos e de seu peso molecular (Neves et al., 2006).

Jun et al. (2004) produziram peptídeos antioxidantes a partir de hidrolisados enzimáticos de linguado de cauda amarela, através de hidrólise com pepsina e enzimas endógenas, e após foram purificados e caracterizados. Os autores determinaram a seqüência de aminoácidos do peptídeo antioxidante isolado e verificaram que o mesmo apresentou 10 resíduos de aminoácidos, contendo resíduos de tirosina, que é um potente doador de hidrogênio. Em função disso, este trabalho teve como objetivo obter diferentes hidrolisados enzimáticos, verificar seu potencial antioxidante e comparar esse efeito entre hidrolisados obtidos a partir de proteína de pescado e frango.

2. MATERIAL E MÉTODOS

As matérias-primas utilizadas para a obtenção dos hidrolisados foram o músculo de frango fornecido pela Cia. Minuano de Alimentos, e músculo de corvina (*Micropogonias furnieri*) doado pela Pescal Indústria de Pescados S.A.

Para obtenção dos hidrolisados utilizou-se a enzima proteolítica Flavouzyme, fornecida pela Novozymes Latin América Ltda. Consultou-se a literatura científica para a determinação das faixas de trabalho, sendo a relação enzima/substrato 1% (p/p), nas faixas ótimas de pH e temperatura da enzima. As reações enzimáticas foram realizadas com volume total de 150 mL em reator encamisado de vidro, numa proporção 1:3 (p/v) utilizando agitador de eixo-hélice a 400 rpm a 50°C durante 60 minutos e pH 7,0 ajustado com NaOH 2N. Tomaram-se amostras no final da reação para a medida do grau de hidrólise de cada ensaio conforme Pezoa e Mellado, citados por Centenaro e Mellado (2008).

Após o término da reação, a enzima foi inativada termicamente a 85°C durante 20 minutos e os hidrolisados foram centrifugados por 3500xg durante 20 minutos para separar os lipídios presentes. Após foram congelados por 15 horas a -70°C e liofilizados durante 24 horas. Os hidrolisados protéicos liofilizados, de frango (HPF) e de corvina (HPP), foram acondicionados em recipientes herméticos até a realização das análises posteriores.

A atividade antioxidante foi medida em sistema modelo com ácido linoléico, de acordo com metodologia de Osawa e Namiki (1985), onde uma amostra (1,3 mg) foi dissolvida em 10 mL de tampão fosfato 50 mM (pH 7,0), adicionando-se em seguida 0,13 mL de ácido linoléico e 10 mL de etanol 99,5%. A seguir, o volume total foi ajustado para 25 mL com água destilada. A mistura foi incubada em um frasco cônico com tampa de rosca a 40 ± 1 °C no escuro e o grau de oxidação foi avaliado medindo a presença de tiocianato férrico. Os valores de tiocianato férrico foram medidos de acordo com o método de Mitsuta et al. (1996). A uma amostra da reação (100 µL) incubada em um sistema modelo com ácido linoléico foi misturado com 4,7 mL de etanol 75%, 0,1 mL de tiocianato de amônio 30%, e 0,1 mL solução de cloreto ferroso 20 mM em HCl 3,5%. Após 3 minutos, os valores de tiocianato, que representam a oxidação do ácido linoléico, foram medidos pela leitura da absorbância a 500 nm seguida do desenvolvimento da cor com o FeCl₂ e tiocianato em diferentes intervalos, durante um período de incubação a 40 ± 1 °C. O número de dias requeridos para atingir a absorbância de 0,3 foi definido como período de indução, o qual se refere à atividade antioxidante relativa das amostras. Utilizou-se como padrão de referência o antioxidante comercial alfa-tocoferol. Uma mistura controle foi preparada usando o mesmo procedimento das amostras, mas sem adição de hidrolisado ou qualquer antioxidante comercial.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 representa a atividade antioxidante dos hidrolisados de frango, de pescado, do α -tocoferol e da amostra controle. Os hidrolisados obtidos apresentaram grau de hidrólise de 46,9 e 59,8% para frango e pescado, respectivamente.

Uma menor absorvância a 500 nm representa maior inibição da oxidação lipídica. Observa-se que os hidrolisados apresentaram maior retardo na peroxidação lipídica que o controle e que o alfa-tocoferol. A amostra controle atingiu absorvância de 0,3 após 3 dias de incubação, seguido do alfa-tocoferol (4 dias) e do HPF (5 dias). O HPP apresentou maior potencial antioxidante que o HPF e que o antioxidante natural durante o período total de seis dias de avaliação.

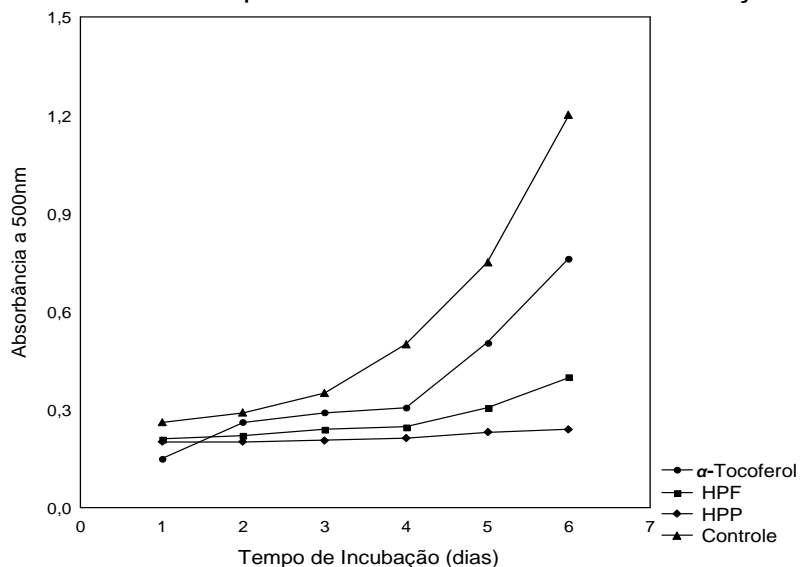


Figura 1: Inibição da peroxidação lipídica apresentada pelos HPF e HPP, quando comparada com o alfa-tocoferol.

Em estudo desenvolvido por Mendis et al. (2005), ao observar a atividade antioxidante de hidrolisados de lula, os autores encontraram resultados semelhantes a este estudo, onde os hidrolisados produzidos também apresentaram atividade antioxidante maior que o alfa-tocoferol.

Durante a hidrólise, a quebra enzimática das proteínas envolve uma maior mudança em sua estrutura, sendo a proteína hidrolisada em pequenas unidades de peptídeos (Kristinsson e Rasco, 2000). Segundo Moosman and Behl (2002), os hidrolisados com maior valor de grau de hidrólise apresentam uma maior quantidade de peptídeos de baixo peso molecular, e conseqüentemente um maior potencial de inibição da oxidação, em relação aos hidrolisados com baixo grau de hidrólise.

Observou-se neste trabalho que o hidrolisado com maior potencial de inibição da peroxidação lipídica (HPP) apresentou o maior grau de hidrólise (59,8%), sugerindo que o HPP provavelmente continha peptídeos de menor peso molecular, em relação ao HPF. Estes resultados concordam com Li et al. (2007), que verificaram que a atividade antioxidante dos hidrolisados foi melhor para aqueles que apresentaram maior grau de hidrólise. Assim, pode-se dizer que o grau de hidrólise exerce importante efeito nas propriedades antioxidantes dos hidrolisados, e que os peptídeos de baixo peso molecular contribuem mais significativamente para a inibição oxidativa do que hidrolisados compostos por polipeptídeos.

4. CONCLUSÕES

O estudo demonstrou que foi possível obter hidrolisados com potencial antioxidante a partir de proteínas de origem animal, particularmente na inibição da peroxidação lipídica em um sistema modelo com ácido linoléico. O HPP obtido com

Flavourzyme apresentou maior inibição da peroxidação lipídica durante um período de incubação de seis dias. Futuras pesquisas são necessárias para purificar e caracterizar os peptídeos responsáveis por essa propriedade antioxidante, assim como para investigar aplicações desses hidrolisados como ingredientes alimentícios ou como produtos nutracêuticos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAILEY, A. E. **Bailey's Industrial Oil and Fat Products**, 5ª ed., John Wiley: New York, v.3, 1996.

CENTENARO, G. S., MELLADO, M. S. Influência das concentrações de enzima e de substrato no grau de hidrólise e no conteúdo protéico de hidrolisados enzimáticos de corvina. **Boletim do Ceppa**, 2008, v. 26, n. 1, p. 61-70.

COSTA, E. L., GONTIJO, J. A. R., NETTO, F. M. Effect of heat and enzymatic treatment on the antihypertensive activity of whey protein hydrolysates. **International Dairy Journal**, 2007, 17, p. 632-640.

JUN, S. H., PARK, P. J., JUNG, W. K., KIM, S. K. Purification and characterization of an antioxidative peptide from enzymatic hydrolysates of yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein. **European Food Research Technology**, 2004, 219, p. 20–26.

KRISTINSSON, H.G., RASCO, B.A. Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical and Functional Properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 2000, v. 40, n.1, p. 43-81.

LI, B., CHEN, F., WANG, X., JI, B. P., WU, Y. Isolation and identification of antioxidative peptides from porcine collagen hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization mass spectrometry. **Food Chemistry**, 2007, 102, p.1135-1143.

MENDIS, E., RAJAPAKSE, N., BYUNB, H.G., KIM, S. K. Investigation of Jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin gelatin peptides for their in vitro antioxidant effects. **Life Sciences**, 2005, 77, p. 2166 – 2178.

MITSUDA, H.; YASUMOTO, K.; IWAMI, K. Antioxidative action of indole compounds during the autoxidation of linoleic acid. **Eiyo to Shokuryo**, 1996, 19, p. 210-214.

MOOSMAN, B., BEHL, C. Secretory peptide hormones are biochemical antioxidants: structure activity relationship. **Molecular Pharmacology**, 2002, 61, p. 260-268.

NEVES, R. A. M., CAMPOS, T., MARQUEZ, U. M. L. Modulação da pressão arterial por hidrolisados protéicos. **Brazilian Journal of Food Technology**, 2006, p. 81-86.

OSAWA, T., NAMIKI, M. Natural antioxidant isolated from eucalyptus leaf waxes. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 1985, 33, p. 770–780.

SETSUNA, K. Antioxidant peptides from the protease digest of prawn (*Penaeus japonicus*) muscle. **Marine Biotechnology**, 2000, 2, p. 5-10.

VIOQUE, J., PEDROCHE, J., YUST, M. M., LQARI, H., MEGÍAS, C., GIRÓN-CALLE, J., ALAIZ, M., MILLÁN, F. Peptídeos bioativos em proteínas vegetais de reserva. **Brazilian Journal of Food Technology**, 2006, p.99-102.