



XXI Congresso Brasileiro
de Engenharia Química

Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o
Ensino de Engenharia Química
Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro

INFLUÊNCIA DO TAMANHO MOLECULAR DAS FRAÇÕES PEPTÍDICAS NA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE HIDROLISADO DE GELATINA DE TILÁPIA

A.I.S. BRÍGIDA¹, C. MELLINGER-SILVA¹, R. ANTONIASSI¹, L.R.F. FARIA², F.S. GOMES¹,
T.F. FONSECA³

¹ EMBRAPA - Embrapa Agroindústria de Alimentos

² IBMR - Instituto Brasileiro em Medicina de Reabilitação

³ UEZO - Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste

E-mail para contato: ana.iraiddy@embrapa.br

RESUMO – O presente trabalho avaliou o efeito do fracionamento de peptídeos de hidrolisado de gelatina de tilápia (HGT) por tamanho molecular no perfil peptídico e na capacidade antioxidante das frações peptídicas obtidas. O HGT foi obtido por hidrólise enzimática e filtrado utilizando membranas de diferentes tamanhos de partícula. A capacidade antioxidante foi avaliada por três metodologias: capacidade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS+) e por inibição da peroxidação lipídica de ácido linoleico. E o perfil peptídico analisado por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. A análise dos perfis peptídicos mostrou não só uma ampla diversidade de moléculas obtidas através do processo de hidrólise e fracionamento, mas também uma diversidade de polaridade nos peptídeos gerados. A remoção de proteínas e de partículas maiores que 100 kDa promoveu um aumento na capacidade antioxidante do fracionado. Todos os filtrados apresentaram valores de capacidade de inibição de peroxidação lipídica próximos. E foi observado que, independente do método utilizado, a fração mais ativa de HGT obtido neste trabalho se encontra em peptídeos com massa molecular menor que 5 kDa.

1. INTRODUÇÃO

A tilápia (*Oreochromis niloticus*) é considerada uma importante espécie na aquicultura de água doce e é muito cultivada no Brasil (155,4 mil ton em 2010), tendo sido observado um aumento considerável na sua produção nos últimos anos (FAO, 2012). Com esta crescente produção, estimulada pelo aumento de consumo, se intensifica a preocupação com a geração de resíduos devido ao seu baixo rendimento em filé (em torno de 30%). Dentre os resíduos do pescado, pele e espinhaço são resíduos ricos em colágeno, que pode ser convertido em gelatina (Zhang *et al.*, 2012). A gelatina, devido a funcionalidades como agente microencapsulante e emulsificante, possui uma vasta aplicação nas indústrias farmacêuticas, alimentícias e de cosméticos (Wang *et al.*, 2009).

PROMOÇÃO

REALIZAÇÃO

ORGANIZAÇÃO



Além da aplicação direta de colágeno e gelatina de peixe, vários estudos têm avaliado a obtenção e aplicação de hidrolisados proteicos. Funcionalidades tecnológicas e biológicas, como atividade crioprotetora (Wang *et al.*, 2009), atividade antioxidante (Ngo *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2012) e atividade anti-hipertensiva (Choonpicharn *et al.*, 2015), agregam valor a estes hidrolisados promovendo amplo espectro de aplicação. Assim, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito do fracionamento de peptídeos de hidrolisado de gelatina de tilápia por tamanho molecular no perfil peptídico e na capacidade antioxidante das frações peptídicas obtidas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

As membranas de fluoreto de polivinilideno para filtração das amostras, assim como o sistema de fluxo tangencial, foram adquiridas pela Sartorius Stedim Biotech. Alcalase® 2.4L foi gentilmente cedida pela Novozymes®. A gelatina de tilápia foi fornecida pela Embrapa Agroindústria Tropical. 2,2'-azinobis 3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico (ABTS), 6-hidroxi-2, 5, 7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico (Trolox), 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH), hidroxitolueno de butila (BHT), α -tocoferol e ácido ascórbico foram adquiridos pela Sigma Chemical Co. (St. Louis, EUA). Demais reagentes de grau analítico.

2.2. Obtenção e fracionamento do hidrolisado

A hidrólise de gelatina de tilápia foi realizada utilizando alcalase® em reator encamisado, sob agitação, pH e temperatura controlados. As condições de reação foram otimizadas em estudo prévio por Faria *et al.* (2015), sendo pH 6, 55°C e relação enzima:substrato de 1:25 as condições selecionadas e utilizadas neste estudo.

Para o fracionamento do hidrolisado, empregou-se um sistema de ultrafiltração com fluxo tangencial. O hidrolisado de gelatina de tilápia (1%) foi filtrado com membrana de 100 kDa e o filtrado submetido a sucessivas filtrações com membranas de porosidade distintas: 50 kDa, 30 kDa, 10 kDa e 5 kDa. Amostras de cada filtrado foram coletadas e analisadas quanto à capacidade antioxidante (DPPH, ABTS e inibição de peroxidação lipídica), perfil peptídico e teor de proteína.

2.3. Capacidade antioxidante pelo método DPPH

A capacidade dos hidrolisados em sequestrar o radical estável DPPH• foi determinada conforme metodologia descrita por Yang *et al.* (2009) com pequenas modificações. Foi preparada uma solução etanólica de DPPH• a 0,1mM. As determinações foram realizadas misturando 1,5 mL da amostra (ABS_A), ou de água (ABS_{Branco}), com 1,5 mL da solução de DPPH•. Após a mistura, o tubo foi agitado em vortex por 10 segundos e, após 30 minutos de repouso em temperatura ambiente, foi realizada a leitura no espectrofotômetro em 517 nm. Ácido ascórbico a 1000 ppm foi utilizado como controle positivo. A atividade em DPPH (AtivDPPH) foi calculada conforme Equação 1.

$$\text{AtivDPPH}(\%) = \frac{\text{ABS}_{\text{Branco}} - \text{ABS}_A}{\text{ABS}_{\text{Branco}}} * 100 \quad (1)$$

2.4. Capacidade antioxidante pelo método ABTS

O método ABTS utilizado foi o método descrito por Re *et al.* (1999) com modificações. Uma vez formado o radical ABTS \cdot^+ , o mesmo foi diluído em etanol até obter-se uma medida de absorbância de 0,70 (\pm 0,02) a um comprimento de onda de 754 nm, a uma temperatura de equilíbrio de 30°C. A absorbância foi medida em espectrofotômetro, em diferentes tempos após a adição da amostra. A curva de correção foi preparada com soluções-padrão de Trolox. Os resultados foram expressos em TEAC, atividade antioxidante equivalente ao Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) em $\mu\text{mol TEAC/g}$ de amostra.

2.5. Capacidade de inibição de peroxidação lipídica

A análise de peroxidação lipídica com o método de ferro tiocianato foi realizada conforme Je *et al.* (2007). A inibição lipídica foi determinada após 6 dias de armazenamento a 40°C. O cálculo de inibição de peroxidação lipídica foi realizado em relação ao controle sem antioxidante nas mesmas condições. Soluções de α -tocoferol (29 $\mu\text{g/ml}$) e BHT (560 $\mu\text{g/ml}$) foram utilizados como padrão. Quando necessário, as amostras de hidrolisado foram diluídas em tampão fosfato pH 7.

2.6. Quantificação do teor de proteína e peptídeos

Teores de proteína e de peptídeos foram quantificados por espectrofotometria com base nas ligações peptídicas, utilizando espectrofotômetro em comprimento de onda de 205 nm (Anthis e Clore, 2013). Gelatina de tilápia liofilizada foi utilizada como padrão. Solução padrão de gelatina (1 mg/ml) foi preparada utilizando água Mili-Q. O percentual de peptídeos (PP) no fracionado foi calculado com base na concentração de proteína e peptídeos no hidrolisado bruto (CPP_{HGT}) e na concentração de peptídeos nos filtrados (CP_F), conforme Equação 2.

$$\text{PP}(\%) = [(\text{CP}_F) / (\text{CPP}_{\text{HGT}})] * 100 \quad (2)$$

2.7. Perfil peptídico

Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC) foi utilizada para analisar os perfis peptídicos do hidrolisado e dos fracionados. As análises de RP-HPLC foram realizadas em cromatógrafo de alta eficiência da marca Jasco, equipado com detector de ultravioleta (UV) e software Jasco ChromNAV. As análises foram realizadas em coluna Hypersil BDS C18 (Thermo), com corridas de 40 minutos, utilizando um fluxo de 1ml/min, à 30°C e com pressão média de trabalho de 12,6 MPa. A detecção foi em 216 nm. A fase móvel foi programada em gradiente (5 – 95%, v/v) de acetonitrila em água, contendo 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA), em ambas as soluções (Mellinger-Silva *et al.*, 2015).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Perfil peptídico de GT, HGT e fracionados

O fracionamento por ultrafiltração é aplicado na purificação de peptídeos obtidos a partir de hidrólise proteica, especialmente para separar frações não hidrolisadas ou de baixo valor agregado. No presente trabalho, a gelatina de tilápia (GT), o hidrolisado bruto de gelatina de tilápia (HGT) e as frações peptídicas obtidas por filtração foram avaliados quanto ao perfil peptídico (Figura 1) e ao percentual mássico de peptídeo em cada fração (Tabela 1). As proteínas de gelatina de tilápia possuem peso molecular maiores que 100 kDa (Fonseca *et al.*, 2015) e apresentam 4 picos intensos entre 20 e 22 min na análise de RP-HPLC (Figura 1). No perfil peptídico do HGT, estes picos de proteínas da gelatina integra estão com intensidade bem mais baixas, prevalecendo os picos referentes aos peptídeos gerados pela hidrólise enzimática, o que confirma a eficiência do processo de hidrólise adotado. De acordo com os dados na Tabela 1, apenas 22,9% em massa da proteína inicialmente presente não foi hidrolisada a frações menores que 100 kDa. Nas filtrações seguintes, as perdas de massa são bem menores, de forma que 65,8% da massa inicial de gelatina de tilápia foi convertida em peptídeos de peso molecular menor que 5 kDa.

Ao analisar o perfil peptídico das frações contendo peptídeos de diferentes massas moleculares (Figura 1), pode-se observar uma vasta população de moléculas em todas as frações. Comparando-se as diferentes frações, é possível perceber certa similaridade entre elas, com picos mais intensos entre 10 e 20 minutos, mostrando não só a ampla diversidade de moléculas obtidas através do processo de hidrólise e fracionamento, mas também a diversidade de polaridade, uma vez que entre esses tempos, a concentração de acetonitrila variou de 5 a 95 %. Mellinger-Silva *et al.* (2015), estudando o perfil peptídico durante a hidrólise de proteína de soro de leite, observou, mesmo no tempo máximo de reação, apenas picos entre 15 e 25 min de retenção, caracterizando a presença apenas de peptídeos mais hidrofóbicos.

Tabela 1 – Percentual em massa de proteína e peptídeos do hidrolisado de gelatina de tilápia e das suas frações obtidas por filtração.

Amostra	%
HGT	100,0
Fração <100 kDa	77,1
Fração <50 kDa	73,8
Fração <30 kDa	66,4
Fração <10 kDa	66,4
Fração <5 kDa	65,8

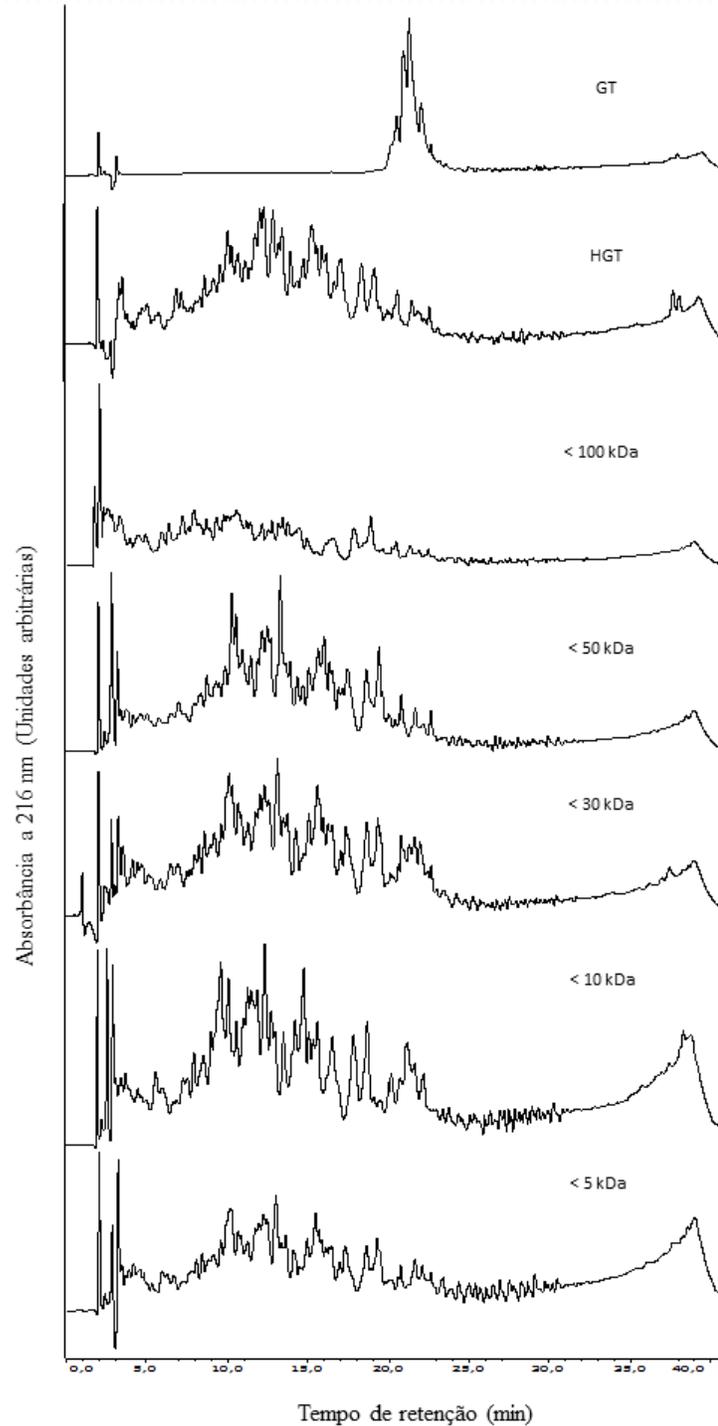


Figura 1 – Perfil peptídico obtido por RP-HPLC de hidrolisado bruto de gelatina de tilápia (HGT) e de hidrolisado fracionado por filtração sequenciada em membrana com diferentes cortes.

3.2. Capacidade sequestrante de DPPH e ABTS

A Figura 2 contém os valores de atividade antioxidante do hidrolisado bruto de gelatina de tilápia (HGT) e das frações peptídicas obtidas por filtração. Avaliando a capacidade antioxidante pelos métodos DPPH e ABTS verificou-se que, com a remoção de proteínas de gelatina não hidrolisadas (maiores que 100 kDa), ocorreu um acréscimo de 2% na atividade antioxidante em DPPH do fracionado e de 100 $\mu\text{mol/g}$ na atividade em ABTS. A inibição da ação antioxidante dos peptídeos pela presença de partículas maiores tem sido relatada na literatura. Farvin *et al.* (2014), por exemplo, observaram menor atividade antioxidante no hidrolisado bruto de “Cod Fish” frente aos fracionados, especialmente na atividade quelante.

As frações obtidas por filtração em membranas de 100 a 10 kDa, não apresentaram diferença de atividade pelo método de sequestro de radical ABTS⁺. Apenas uma queda de 25 $\mu\text{mol/g}$ foi observada nos valores do filtrado em 10 kDa para 5 kDa, indicando que uma pequena fração ativa (0,6%) foi retida na filtração em membrana de 5 kDa. Contudo, pelo método de sequestro de DPPH[•], observou-se aumento de 5% na atividade ao remover partículas maiores que 50 kDa. A quantidade de partículas com tamanho entre 100 e 50 kDa retida foi de 3,3%. Não houve diferença para os demais permeados obtidos com membrana de 30, 10 e 5 kDa em ambos os métodos de capacidade sequestrante utilizados. Vários trabalhos têm reportado frações peptídicas bastante ativas abaixo de 10 kDa (Choonpicharn *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2009), sendo as mais ativas com peso molecular menor que 2 kDa (Yang *et al.*, 2009).

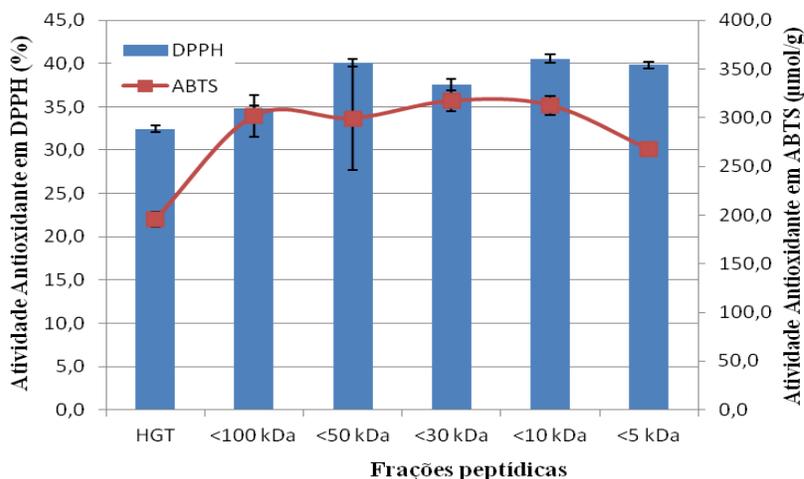


Figura 2 – Atividade antioxidante pelo método DPPH e ABTS do hidrolisado bruto de gelatina de tilápia (HGT) e de hidrolisados fracionados por filtração sequenciada em membrana com diferentes cortes.

3.3. Inibição de peroxidação lipídica

O teste de inibição de peroxidação lipídica foi positivo em todas as amostras avaliadas (Figura 3). O hidrolisado bruto de gelatina de tilápia obtido neste trabalho fazendo uso de alcalase apresentou 37% de inibição de peroxidação lipídica. Choonpicharn *et al.* (2015), utilizando a mesma enzima,

embora em condições reacionais distintas, obteve um hidrolisado de gelatina de tilápia que apresentou 29% de inibição de peroxidação lipídica. Este resultado evidencia o quanto as condições reacionais podem influenciar na atividade dos hidrolisados obtidos, como reportado na literatura (Faria *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2009). O filtrado de 50 kDa apresentou o valor máximo obtido neste estudo de 42% de inibição. Após este permeado ser filtrado em membrana de 30 kDa, a inibição promovida foi de 35%, menor valor encontrado neste ensaio. Esta diferença de 7% na inibição está relacionada a retenção de peptídeos de tamanhos entre 50 e 30 kDa durante a filtração, o que correspondeu a uma redução de 7,4% em massa na concentração de peptídeos do permeado de 30 kDa frente ao permeado de 50 kDa.

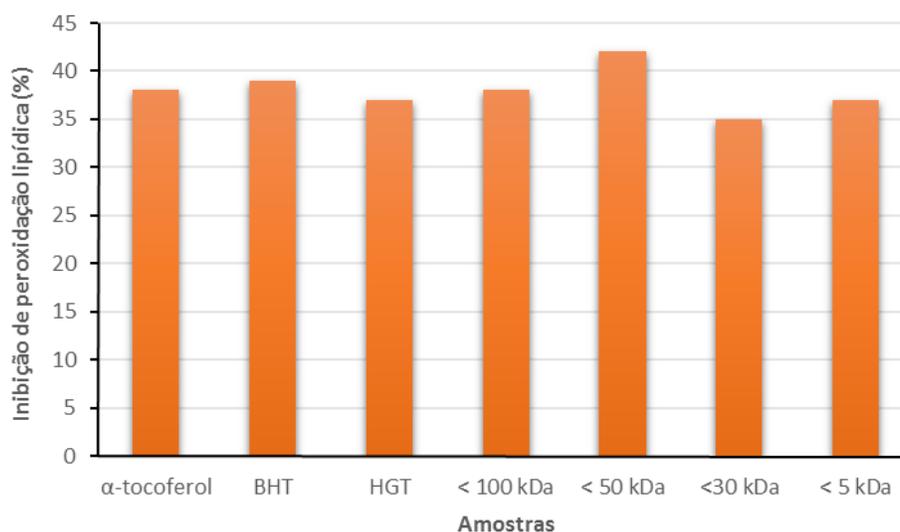


Figura 3 – Valores de percentual de inibição de peroxidação lipídica das soluções padrões de α -tocoferol (29 $\mu\text{g}/\text{ml}$) e BHT (560 $\mu\text{g}/\text{ml}$), do hidrolisado bruto de gelatina de tilápia (HGT) e de hidrolisados fracionados por filtração sequenciada em membrana com diferentes cortes.

4. CONCLUSÕES

Tendo-se observado grande quantidade da atividade antioxidante presente no permeado da filtração de 5 kDa tanto pelos métodos de DPPH e ABTS quanto por inibição de peroxidação lipídica de ácido linoleico, pode-se concluir que a fração mais ativa deste hidrolisado encontra-se em peptídeos com massa molecular menor que 5 kDa. Logo, mais estudos de caracterização voltados para essa fração devem ser realizados em trabalhos futuros.

4. REFERÊNCIAS

ANTHIS, N.J.; CLORE, G.M. Sequence-specific determination of protein and peptide concentrations by absorbance at 205 nm. *Prot. Sci.*, v. 22, p 851-858, 2013.

CHOONPICHARN, S., JATURASITHA, S., RAKARIYATHAM, N., SUREE, N., NIAMSUP, H. Antioxidant and antihypertensive activity of gelatin hydrolysate from Nile tilapia skin. *J. Food*

Sci. Technol., v. 52, p. 3134-3139, 2015.

FAO. *World review of fisheries and aquaculture*. Rome. 147pp. 2012.

FARIA, L. R. F.; FONSECA, T. F. DA; BRIGIDA, A. I. S.; SILVA, C. M.; SANTOS, A. A. dos; AZEVEDO, T. de L. Efeito das condições de reação na obtenção de hidrolisado de gelatina de tilápia com atividade antioxidante. In: *SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS*, 20.; *SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSA*, 11., 2015, Fortaleza. [Anais...]. São Paulo: Associação Brasileira de Engenharia Química, 2015. 6 p.

FARVIN, K.H.S.; ANDERSEN, L.L.; NIELSEN, H.H.; JACOBSEN, C.; JAKOBSEN, G.; JOHANSSON, I.; JESSEN, F. Antioxidant activity of Cod (*Gadus morhua*) protein hydrolysates: *In vitro* assays and evaluation in 5% fish oil-in-water emulsion. *Food Chem.*, v. 149, p. 326-334, 2014.

FONSECA, T.F.; FARIA, L.R.F.; BRIGIDA, A.I.S.; SILVA, C.M.; SANTOS, A.A. DOS; AZEVEDO, T.L. Avaliação do potencial de flavourzyme, neutrase e novo-Pro D na hidrólise de gelatina de tilápia. In: *SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS*, 20.; *SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSA*, 11., 2015, Fortaleza. [Anais...]. São Paulo: Associação Brasileira de Engenharia Química, 2015. 6 p.

JE, J.-Y.; QIAN, Z.-J.; BYUN, H.-G.; KIM, S.-K. Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. *Process Biochem.*, v. 42, p. 840-846, 2007.

MELLINGER-SILVA, C.; ROSA, L. O. L.; STEPHAN, M. P.; BRIGIDA, A. I. S.; CABRAL, L. M. C.; SILVA, G.O.; GUARIDO, K. L.; GOMES, D. M.; SILVA-SANTOS, J. E. Dual function peptides from pepsin hydrolysates of whey protein isolate. *Int. Dairy J.*, v. 48, p. 73-79, 2015.

NGO, D.-H.; QIAN, Z.-J.; RYU, B.; PARK, J.W.; KIM, S.-K. In vitro antioxidant activity of a peptide isolated from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) scale gelatin in free radical-mediated oxidative systems. *J. Funct. Foods*, v. 2, p. 107-117, 2010.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 29, p. 1231-1237, 1999.

WANG, S.; AGYARE, K.; DAMODARAN, S. Optimisation of hydrolysis conditions and fractionation of peptide cryoprotectants from gelatin hydrolysate. *Food Chem.*, v. 115, p. 620-630, 2009.

YANG, J.-I., LIANG, W.-S., CHOW, C.-J., SIEBERT, K.J. Process for the production of tilapia retorted skin gelatin hydrolysates with optimized antioxidative properties. *Process Biochem.*, v. 44, p. 1152-1157, 2009.

ZHANG, Y.; DUAN, X.; ZHUANG, Y. Purification and characterization of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin gelatin. *Peptides*, v. 38, p. 13-21, 2012.