



## ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE HIDROLISADOS DA TORTA DE SOJA CONTRA *Salmonella Enteritidis*

### ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF SOYBEAN CAKE HYDROLYSATES AGAINST *Salmonella Enteritidis*

Natália BOIA<sup>1</sup>, Ana Lúcia PENTEADO<sup>2</sup>, Gabriela DIAS<sup>3</sup>, Alexandre PORTE<sup>4</sup>, Maria Gabriela Bello KOBLITZ<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Nutricionista, mestranda em Alimentos e Nutrição – PPGAN/UNIRIO

<sup>2</sup> Pesquisadora – Embrapa Agroindústria de Alimentos

<sup>3</sup> Aluna de graduação em Nutrição – UNIRIO

<sup>4</sup> Professor adjunto – DTA/EN/UNIRIO

<sup>5</sup> Professora adjunta – DTA/EN/UNIRIO

Palavras-chave: peptídeos bioativos, proteases, pH.

#### Introdução

Inúmeras definições têm sido dadas para peptídeos bioativos e uma das mais apropriadas seria a seguinte: trata-se de fragmentos de proteínas específicas, que compõem os alimentos, que podem exercer uma atividade de regulação no organismo humano independentemente das suas funções nutritivas, podendo influenciar a saúde dos indivíduos (KORHONEN; PIHLANTO, 2006).

Leite e outros produtos lácteos estão entre os melhores precursores de peptídeos bioativos e têm sido extensivamente estudados. No entanto, estes peptídeos também têm sido isolados e caracterizados a partir de outras fontes alimentares de proteína, incluindo ovos, peixes, ostras, cereais (arroz, trigo, trigo sarraceno, cevada, milho), soja e sementes de rabanete (WU; DING, 2002). A soja é uma importante fonte de proteína e uma potencial fonte de peptídeos bioativos (de MEJIA; de LUMEN, 2006). Em média, a soja contém cerca de 40% de proteínas, sendo este percentual composto por uma mistura complexa de tipos de proteínas diferentes (WANG; MEJIA; GONZALEZ, 2005). A torta de soja, um subproduto obtido durante o processamento de óleo de soja, apresenta-se como uma fonte de isoflavonas. No entanto, a variedade de outros componentes funcionais presentes na torta de soja permanece desconhecida (KAO; CHEN, 2006).

Numerosas pesquisas têm descrito diferentes atividades fisiológicas e metabólicas após ensaios *in vivo* e *in vitro* com proteínas e peptídeos bioativos. Dentre os mais estudados encontra-se o efeito antimicrobiano (AGYEI; APOSTOLOPOULOS; DANQUAH, 2011. LÓPEZ-EXPÓSITO et al., 2007).

Peptídeos antimicrobianos podem ser gerados a partir de hidrólise enzimática (KIM; WIJESEKARA, 2010). Em se tratando de alimentos funcionais, a utilização de hidrolisados protéicos não-purificados (onde há a mistura de vários peptídeos) ao invés de um único peptídeo purificado, demonstra melhores atividades biológicas, quando aplicados em alimentos (SARMADI; ISMAIL, 2010. WU; DING, 2002).

A descoberta de novas substâncias antimicrobianas faz-se necessária devido ao desenvolvimento progressivo de resistência por microrganismos patogênicos contra antibióticos convencionais (KIM; WIJESEKARA, 2010). Tudo indica que conservadores naturais, particularmente em adição ou combinação sinérgica com outros fatores e técnicas que já estão em uso, terão um papel importante em um futuro próximo, principalmente se estes agentes tiverem nos alimentos a mesma ação efetiva verificada em ensaios laboratoriais (SCHULZ et al., 2009).

Dados da Secretaria de Vigilância em Saúde de 2008 revelam que o principal agente etiológico de surtos de doenças transmitidas por alimentos é *Salmonella* spp., sendo *Salmonella* Enteritidis identificada em 4,0% dos surtos com origem bacteriana (BRASIL, 2008).



Tendo em vista todos estes aspectos, objetivou-se com o presente trabalho verificar a atividade antimicrobiana de peptídeos obtidos através da hidrólise enzimática da torta de soja contra *S. Enteritidis*.

## Material e Métodos

### 1. Extração de proteínas da torta de soja

A torta de soja seca, desengordurada e dessolventizada foi moída em moinho de facas. A extração das proteínas foi realizada utilizando a proporção de 5g de torta para 100mL de solução tampão no valor de pH 9,0 (BOIA; KOBLITZ, 2012). A amostra foi homogeneizada em blender durante 2 minutos e posteriormente filtrada em filtro de algodão. Este filtrado foi submetido à centrifugação a 4.000xg durante o período de 15 minutos (SILVA et al., 2012).

### 2. Estudo das condições de reação para obtenção dos hidrolisados (adaptado de Contreras et al., 2011)

Foi realizado um planejamento fatorial completo ( $2^n$ ) utilizando como fatores de variação: a razão entre enzima e proteína (1:66,66; 1:100 e 1:200); tempo de reação (1, 3 e 5h); temperatura de reação (30, 50 e 70°C) e pH (4,0; 7,0 e 10,0). Como variável dependente (resposta) foi utilizado o resultado da avaliação da atividade antimicrobiana.

### 3. Obtenção dos hidrolisados (adaptado de Contreras et al. (2011)

Cinquenta mililitros de proteínas extraídas de torta de soja em solução tampão de acordo com o planejamento experimental foram aquecidos a 95°C por 15 minutos, para provocar desnaturação das proteínas e facilitar a ação enzimática. Em seguida, as amostras foram resfriadas em banho de gelo até a temperatura de ensaio e mantidas em banho de aquecimento na temperatura indicada. Uma solução contendo a protease, na concentração correta, foi então adicionada, dando início à reação. Para paralização da reação, após o período de tempo e sob a temperatura determinados no planejamento, o meio reacional foi aquecido a 100°C por 10 minutos e resfriado em banho de gelo. O produto obtido foi centrifugado a 10.000xg por 10 minutos e o sobrenadante foi alíquotado, congelado e liofilizado.

### 4. Avaliação do rendimento da reação (adaptado de Zhong et al. (2007)

O rendimento da hidrólise foi calculado pela razão entre a concentração de proteínas (aminoácidos e peptídeos) no sobrenadante final e a concentração de proteínas no substrato inicial da reação.

Para determinação da concentração de proteína nas amostras foi utilizado o método de Lowry (1951).

### 5. Avaliação da atividade antimicrobiana dos hidrolisados contra *Salmonella* Enteritidis

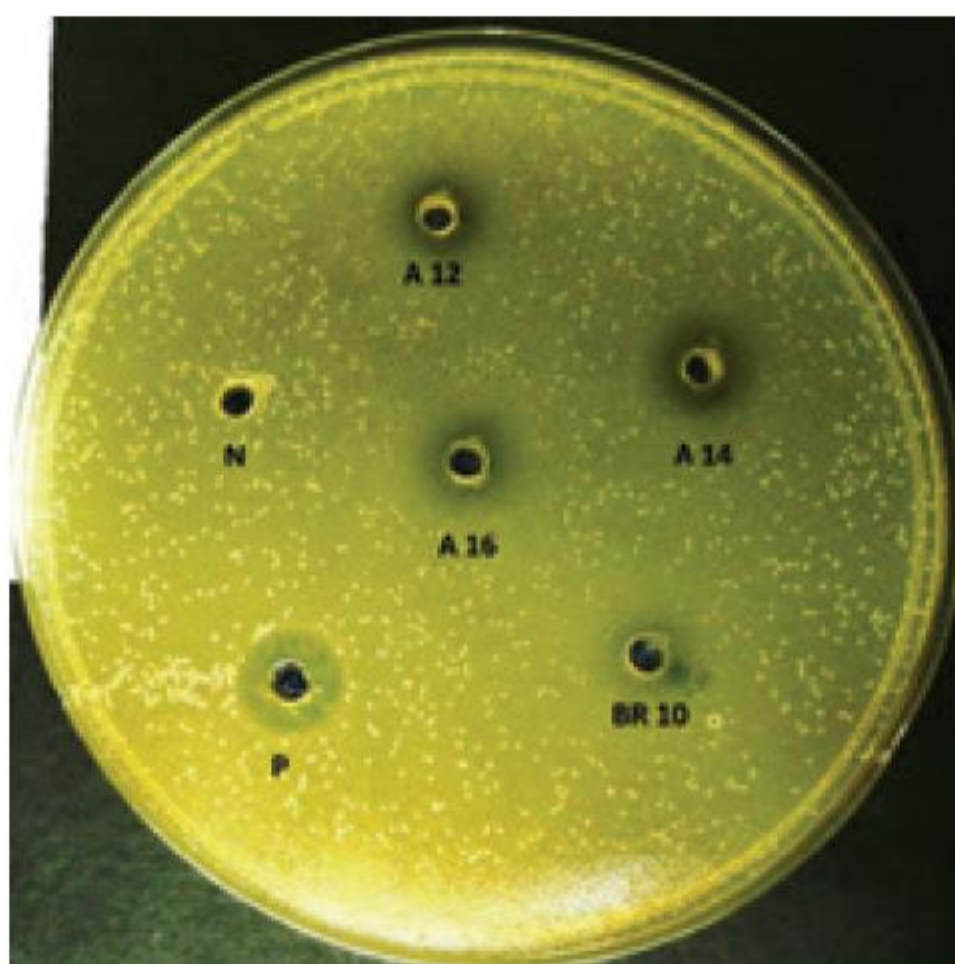
Foi utilizado o método de difusão em poços de ágar (WAN; WILCOCK; COVENTRY, 1998). Cepas padrão de *S. Enteritidis* provenientes da coleção de culturas do laboratório de Microbiologia de Alimentos da Embrapa Agroindústria de Alimentos (CTAA) foram utilizadas neste estudo.

### 6. Análise estatística

As planilhas de ensaio, avaliação dos resultados e a análise de superfície de resposta foram elaboradas com auxílio do software STATISTICA (7.0). Os demais ensaios foram avaliados por análise de variância seguida do teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ ).

## Resultados e Discussão

Segundo os resultados obtidos no presente estudo, os hidrolisados proteicos obtidos da torta de soja parecem possuir atividade inibitória ao crescimento de *S. Enteritidis*. A Figura 1 mostra os halos de inibição dos melhores resultados.

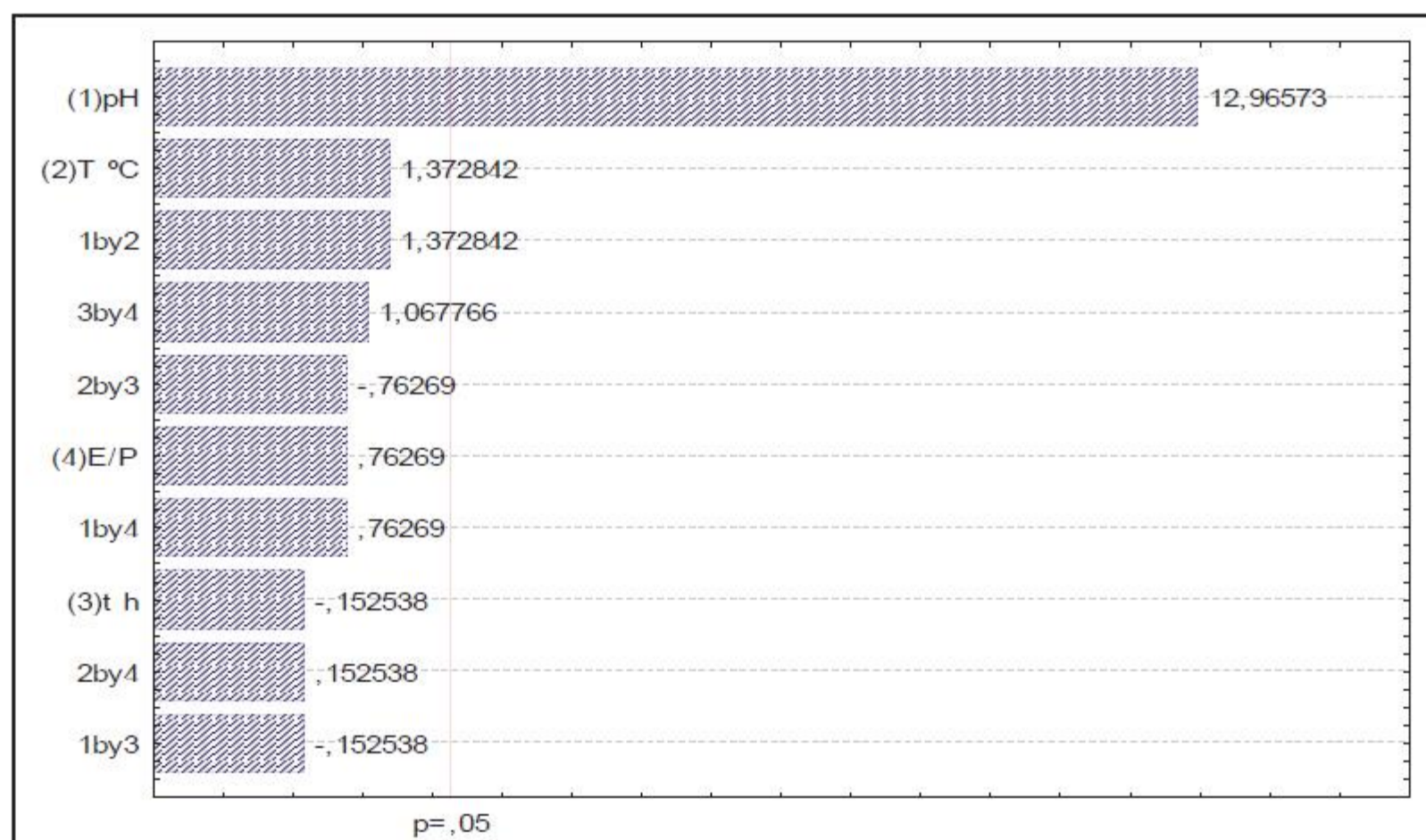


**Figura 1.** Atividade antimicrobiana de hidrolisados proteicos contra *S. Enteritidis*. A 12) 70°C por 1h em pH 10,0; A 14) 30°C por 5h em pH 10,0; A 16) 70°C por 5h em pH 10,0; BR 10 - Extrato protéico em pH 10,0 sem adição de enzima; P - Controle Positivo; N - Controle Negativo.

O estudo das condições de reação para obtenção dos hidrolisados do extrato proteico da torta de soja foi realizado visando avaliar quais das variáveis analisadas (pH, temperatura, tempo de reação, relação enzima:substrato) apresentavam diferença significativa no efeito inibitório, para então obter-se as condições ótimas de hidrólise que proporcionam a maior atividade antimicrobiana contra cepas de *S. Enteritidis*.

Temperatura e pH estão entre os mais importantes fatores ambientais que influenciam a atividade enzimática (DAMODARAN; PARKIN, 2010). Na Figura 2 é possível verificar que o pH é única variável que interfere positivamente, de forma significativa, na atividade antimicrobiana dos hidrolisados avaliados.

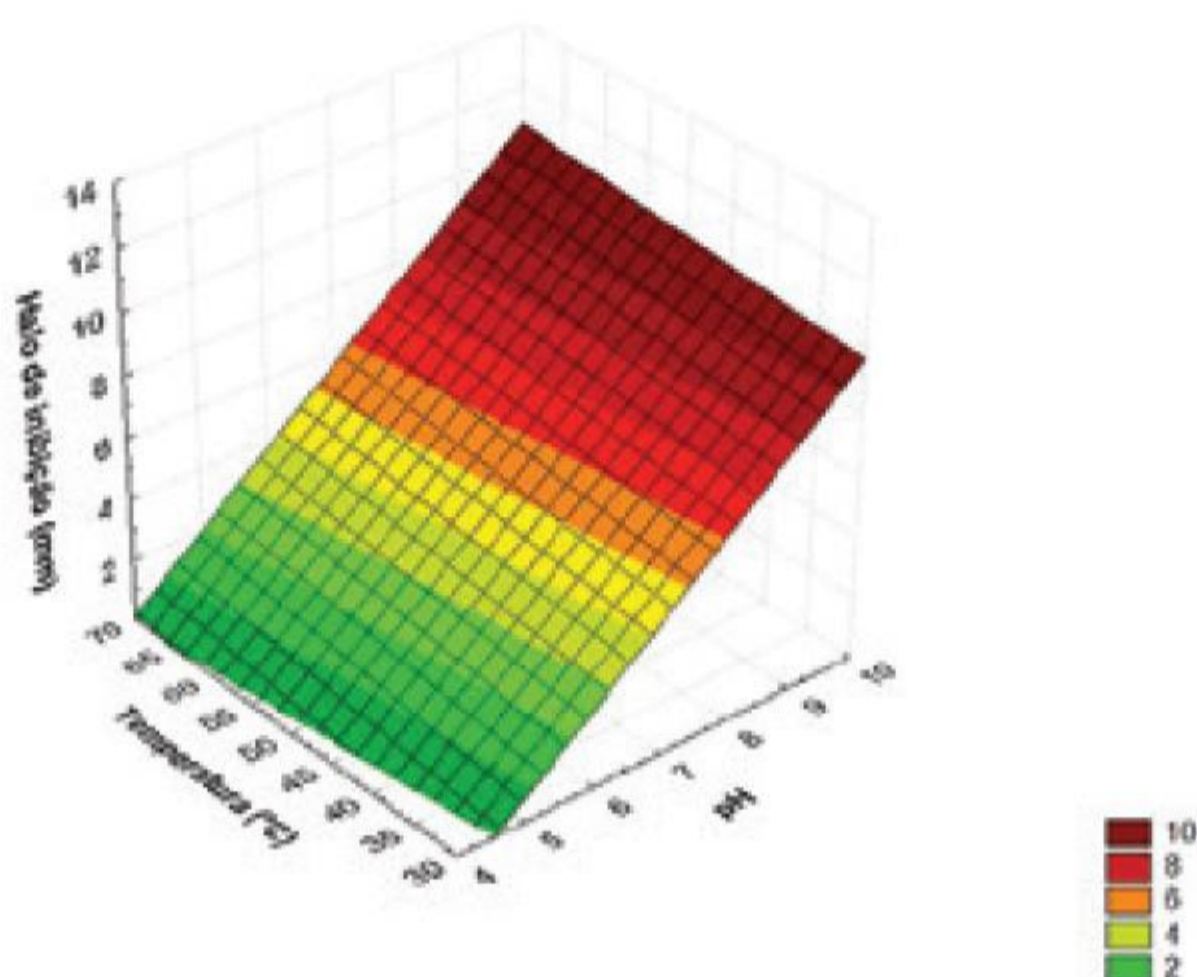
Burris (2004 apud CHRISTMAN, 2010 p. 52) levantou a questão do efeito da variação do pH na potencial atividade antimicrobiana de peptídeos e descobriu que ao alterar o pH o peptídeo se tornou ineficaz contra a *Salmonella typhimurium* e diminuiu ligeiramente a eficácia da supressão do crescimento de *Listeria monocytogenes*, descobrindo assim que o pH desempenha um papel no efeito inibitório de peptídeos antimicrobianos. Murdock (2002) e Wakabayshi et al. (1992) descobriram que isto é verdade para lactoferrina, que é o peptídeo obtido a partir da hidrólise de lactoferrina com pepsina.





**Figura 2.** Diagrama de Pareto para análise das variáveis utilizadas no processo de hidrólise.

Analisando a Figura 3 é possível observar que a relação entre o pH e diâmetro (mm) do halo de inibição ocorre de forma crescente e linear, ou seja, quanto mais alcalino foi o pH utilizado, maior o halo de inibição que os hidrolisados geraram, e conseqüentemente maior foi a atividade antimicrobiana contra o microrganismo em questão.



**Figura 3.** Gráfico de superfície de resposta, levando em consideração as variáveis pH e tempo de reação para a resposta diâmetro do halo de inibição, a um nível de significância de 99% ( $p > 0,01$ ). ( $r^2=0,91446$ ).

### Conclusão

Os hidrolisados proteicos obtidos da torta de soja, por hidrólise enzimática utilizando protease comercial sob condições onde o pH do meio reacional é neutro ou alcalino, possuem atividade antimicrobiana contra *S. Enteritidis*. Concluiu-se que a maior atividade antimicrobiana nas condições observadas no presente trabalho ocorre em pH 10,0.

### Referências Bibliográficas

- AGYEI, D.; APOSTOLOPOULOS, V.; DANQUAH, M. Rethinking Food-derived Bioactive Peptides for Antimicrobial and Immunomodulatory activities. **Trends in Food Science & Technology**, Elsevier, 2011.
- BOIA, N.; KOBELITZ, M.G.B. Optimization of protein extraction from soybean cake. In: **16th World Congress of Food Science and Technology - IUFoST**, 2012. v. 1. p. 10580-10580, Foz do Iguaçu, 2012.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Análise epidemiológica dos surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil**. Brasília: MS, 2008. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/surtos\\_dta\\_15.pdf94](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/surtos_dta_15.pdf94)>. Acesso em: 8 dez. 2012.
- CHRISTMAN, J. M. **Antimicrobial Activity of Casein Hydrolysates against Listeria monocytogenes and Escherichia coli O157:H7**. Master's Thesis, University of Tennessee, 2010.
- CONTRERAS M.M. et al. Production of antioxidant hydrolyzates from a whey protein concentrate with thermolysin: Optimization by response surface methodology. **LWT - Food Science and Technology** 44: 9-15, 2011.
- DAMODARAN, S.; PARKIN, K. **Química de alimentos de fennema**. Porto Alegre: Artemed, 2010.



- de MEJIA, E.; de LUMEN, B. **Soybean bioactive peptides: A new horizon in preventing chronic diseases**. In: Sexuality, Reproduction and Menopause, Elsevier, 4, 91-95, 2006.
- KAO, T.; CHEN, B. Functional components in soybean cake and their effects on antioxidant activity. **Journal of agricultural and food chemistry**, ACS Publications, 54, 7544-7555, 2006.
- KIM, S.; WIJESEKARA, I. Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. **Journal of Functional Foods**, Elsevier, 2, 1-9, 2010.
- KORHONEN, H.; PIHLANTO, A. Bioactive peptides: production and functionality. **International Dairy Journal**, Elsevier, 16, 945-960, 2006
- LÓPEZ-EXPÓSITO, I. et al. Casein hydrolysates as a source of antimicrobial, antioxidant and antihypertensive peptides. **Le Lait**, 87, 241-249, 2007.
- LOWRY, O.H. et al. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. **Journal of Biological Chemistry**. 193: 265-275. 1951.
- MURDOCK, C. A.; MATTHEWS, K.R. Antibacterial activity of pepsin-digested lactoferrin on foodborne pathogens in buffered broth systems and ultra-high temperature milk with EDTA. **J. Appl. Microbiol.** 93:850–856, 2002.
- SARMADI, B.; ISMAIL, A. Antioxidative peptides from food proteins: A review. **Peptides**, Elsevier, 31, 1949-1956, 2010.
- SCHULZ, D. et al. Bacteriocinas: mecanismo de ação e uso na conservação de alimentos. **Alimentos e Nutrição** Araraquara, 14, 2009.
- SILVA, B.A. et al. Aplicação da metodologia de superfície de resposta no estudo da extração de ricina em torta de mamona (*Ricinus communis* L.). **Ciência Rural** (UFSC. Impresso), v. 42, p. 1320-1326, 2012.
- WAKABAYASHI, H. et al. Inactivation of *Listeria monocytogenes* by lactoferricin, a potent antimicrobial peptide derived from cow's milk. **J Food Prot.** 55:238–240, 1992.
- WAN, J.; WILCOCK, A.; COVENTRY, M.J. The effect of essential oils of basil on the growth of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*. **Journal of Applied Microbiology**. 84: 152-158, 1998.
- WANG, W.; MEJIA, D.; GONZALEZ, E. A New Frontier in Soy Bioactive Peptides that May Prevent Age-related Chronic Diseases. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, Wiley Online Library, 4, 63-78, 2005.
- WU, J.; DING, X. Characterization of inhibition and stability of soy-protein-derived angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides. **Food Research International**, Elsevier, 35, 367-375, 2002.
- ZHONG, F. et al. Preparation of hypocholesterol peptides from soy protein and their hypocholesterolemic effect in mice. **Food Research International** 40: 661–667. 2007.

Autor a ser contatado: Natália Boia Soares, nutricionista, mestrandia em Alimentos e Nutrição – UNIRIO/Rio de Janeiro-RJ – e-mail: nat\_boia@hotmail.com