

Atividade antioxidante de peptídeos da biomassa microalgal

Aline Massia Pereira¹, Cristiane Reinaldo Lisboa¹ e Jorge Alberto Viera Costa¹

¹Universidade Federal do Rio Grande – Escola de Química e Alimentos – Laboratório de Engenharia Bioquímica
Caixa Postal 474 – CEP 96201-900 Rio Grande – Rio Grande do Sul - E-mail:
(jorgealbertovc@terra.com.br)

RESUMO

A biomassa de microalgas vem sendo estudada devido à obtenção de diversos compostos com elevado valor agregado, entre elas a microalga Chlorella. O objetivo deste trabalho foi produzir hidrolisados proteicos com atividade antioxidante a partir da biomassa da microalga Chlorella pyrenoidosa. Delineamento composto rotacional do tipo 2² foi realizado, sendo que as variáveis estudadas foram a concentração de substrato e tempo de reação sobre a resposta grau de hidrólise. A capacidade antioxidante dos hidrolisados proteicos e da biomassa foi determinada pelos métodos de poder redutor, DPPH e ABTS. A hidrólise enzimática das proteínas gerou aumento da capacidade antioxidante dos hidrolisados. Através dos resultados obtidos, constatou-se que é possível obter peptídeos biologicamente ativos com atividade antioxidante a partir de biomassa microalgal.

Palavras-chave: biopeptídeos, hidrólise enzimática, microalga.

INTRODUÇÃO

Das fontes naturais de antioxidantes, que não causam efeito danoso ao organismo (antioxidantes artificiais), diversos pesquisadores têm apresentado interesse em estudar fontes marinhas como um recurso biológico (GOIRIS; MUYLAERT; DE COOMAN, 2015). A microalga *Chlorella* é um gênero das algas verdes unicelulares e vem sendo reportada como produto de gênero alimentício que contém proteína, minerais, vitaminas, clorofila e substâncias bioativas. Diversos estudos têm indicado a variedade de benefícios proporcionados pela microalga, incluindo capacidade antioxidante (SAFI et al., 2014).

Espécies reativas de oxigênio (ROS) podem ser perigosos e geralmente são formados em condições de estresse em organismos aeróbios (GÜLÇİN, 2012). O aparecimento de aterosclerose, doenças coronárias, hipertensão, diabetes, envelhecimento, mal de Alzheimer e câncer podem ser conduzidos pela produção incontrolada de ROS e pelo desequilíbrio do sistema de proteção antioxidante (NGO et al., 2010). Além disso, a oxidação de gorduras e óleos nos produtos alimentares durante o processamento e armazenamento leva à produção de produtos secundários indesejáveis da peroxidação lipídica (SARMADI e ISMAIL, 2010). Portanto, antioxidantes são importantes para prevenção de doenças e no armazenamento e estocagem de produtos alimentícios.

O objetivo deste estudo foi produzir hidrolisados proteicos que contenham peptídeos biologicamente ativos com atividade antioxidante a partir da biomassa da microalga *Chlorella pyrenoidosa* utilizando a enzima comercial Protamax 580 L.

MATERIAL E MÉTODOS

A biomassa da microalga *Chlorella pyrenoidosa* foi utilizada, adquirida em pó, produzida por Fuqing King Dnarmsa Co. Ltd., China e a enzima utilizada foi a Protamax 580L de *Bacillus licheniformis* (Prozyn, São Paulo – SP). A atividade da enzima foi definida segundo o método descrito por Ma et al. (2007).

As reações de hidrólise foram conduzidas em tampão bicarbonato carbonato de sódio pH 9,5, com agitação de 180 rpm e temperatura constante de 55 °C (temperatura ótima de atividade da enzima). Ao término da reação, a enzima foi inativada termicamente a 85 °C por 10 min. O grau de hidrólise foi determinado segundo o método descrito por Hoyle e Merrit (1994), sendo expresso como a porcentagem de proteínas solúveis no TCA em relação à quantidade de proteína inicial total, e calculado segundo a Equação (1). A concentração de enzima adicionada foi de 5 U.mL⁻¹ para todos os ensaios.

$$\%GH = \frac{(PS_{tf} - PS_{t0}) \times 100}{P_t} \quad (1)$$

O branco, PS_{t0}, correspondeu à quantidade de proteína solúvel em TCA 6,25% antes da adição da enzima; PS_{tf} foi a quantidade de proteína solúvel em determinado tempo após a adição da enzima e P_t foi a quantidade de proteína total na amostra determinada por micro Kjeldahl (N x 6,25).

A concentração de substrato e tempo de reação foram determinados de acordo com delineamento composto central rotacional (DCCR) do tipo 2², com três pontos centrais e com pontos axiais realizado (11 experimentos). O efeito das variáveis independentes sobre o GH foi avaliado estatisticamente de modo a fazer análise de efeitos e verificação de modelos empíricos através dos coeficientes de regressão e análise de variância (ANOVA) (dados não apresentados). As análises foram realizadas em duplicata e os dados tratados por erro global a 5% de significância.

Os métodos de capacidade de sequestro do radical livre DPPH (RUFINO et al., 2007b), captura do radical livre ABTS (RUFINO et al., 2007a) e poder redutor (OYAIZU, 1986), baseados em diferentes princípios, foram selecionados para mensurar a atividade antioxidante dos hidrolisados de microalga. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram avaliados por análise de variância e comparação de médias através do teste de Tukey a 5% de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com o modelo preditivo verificado (R = 0,87), aumento da concentração de substrato de 3,2 a 8,8 % gerou diminuição do GH e o aumento do tempo de reação de 80 para 220 min gerou aumento da resposta GH. A Tabela 1 apresenta a matriz do delineamento composto central com a resposta grau de hidrólise e os resultados da atividade antioxidante dos hidrolisados de microalga estão apresentados na Tabela 2.

Observa-se que pelos métodos de DPPH e ABTS, os hidrolisados proteicos apresentam maior atividade antioxidante em relação à biomassa não hidrolisada. A atividade antioxidante determinada pelo método do poder redutor, dos hidrolisados 1, 3, 4, 5, 6 e a biomassa não hidrolisada não apresentaram diferença significativa (p < 0,05).

Hidrolisados proteicos com maior grau de hidrólise obtiveram melhores resultados de atividade antioxidante para os 3 diferentes métodos de análise estudados. Hidrolisados com elevado grau de hidrólise apresentam maior quantidade de peptídeos de baixo peso molecular, e consequentemente maior potencial de inibição de oxidação, em relação aos hidrolisados com baixo grau de hidrólise (MOOSMAN e BEHL, 2002).

Tabela 1 - Matriz do delineamento composto central rotacional 2^2 e a resposta GH.

Ensaio	Valores codificados e reais		GH (%)
	CS (%)	t (min)	
1	-1 (4)	-1 (100)	40,2
2	+1 (8)	-1 (100)	26,7
3	-1 (4)	+1 (200)	54,8
4	+1 (8)	+1 (200)	38,7
5	-1,41 (3,2)	0 (150)	41,3
6	+1,41 (8,8)	0 (150)	31,9
7	0 (6)	-1,41 (80)	25,4
8	0 (6)	+1,41 (220)	48
9	0 (6)	0 (150)	41,2
10	0 (6)	0 (150)	41,9
11	0 (6)	0 (150)	42,7

Tabela 2 - Atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos e da biomassa microalgal.

Hidrolisado proteico	Poder redutor (Abs 700nm)	DPPH (% de inibição)	ABTS (mM trolox/g de amostra)
1	0,4896 ^b ± 0,0038	33,55 ^f ± 1,60	0,145 ^d ± 0,006
2	0,5390 ^a ± 0,0110	39,06 ^c ± 2,57	0,093 ^e ± 0,002
3	0,4886 ^b ± 0,0083	47,27 ^b ± 1,31	0,151 ^d ± 0,001
4	0,5033 ^b ± 0,0035	43,35 ^{b,c} ± 1,18	0,117 ^{c,b} ± 0,005
5	0,4953 ^b ± 0,0049	39,90 ^c ± 1,28	0,157 ^d ± 0,015
6	0,5360 ^a ± 0,0099	31,96 ^{d,f} ± 0,84	0,094 ^e ± 0,006
7	0,5563 ^a ± 0,0055	31,75 ^{d,f} ± 1,15	0,126 ^b ± 0,003
8	0,4860 ^b ± 0,0035	32,90 ^f ± 1,28	0,161 ^d ± 0,001
9	0,5370 ^a ± 0,108	26,87 ^e ± 2,04	0,095 ^e ± 0,004
10	0,5463 ^a ± 0,0062	28,52 ^{d,e} ± 1,27	0,103 ^e ± 0,004
11	0,5376 ^a ± 0,0061	26,14 ^e ± 0,97	0,105 ^e ± 0,007
Microalga não hidrolisada	0,4933 ^b ± 0,0042	14,61 ^a ± 1,15	0,018 ^a ± 0,001

*Para todos os ensaios de hidrolisados proteicos realizados, nos valores de absorbância média, porcentagem de inibição e mMol de Trolox/g de amostra, letras iguais indicam que não há diferença significativa e letras distintas indicam diferença significativa a 95% de confiança.

Os valores de absorvância a 700 nm para os 11 ensaios e microalga não hidrolisada revelaram que todas as amostras apresentaram capacidade de reduzir o Fe^{+3} . Observou-se que o efeito sequestrante do radical DPPH para os experimentos com a microalga hidrolisada (26,14 - 47,27%) aumentou consideravelmente quando comparado com a biomassa intacta (14,61%), ou seja, a hidrólise enzimática gerou um aumento de 3,2 vezes na sua capacidade antioxidante quando comparado com a biomassa intacta. Os hidrolisados proteicos atingiram valores máximos de TEAC 0,161 mMol de Trolox/g de amostra, gerando um aumento de 9 vezes na sua capacidade antioxidante quando comparado com a biomassa não hidrolisada.

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.

CONCLUSÕES

A hidrólise enzimática da proteína da microalga *Chlorella pyrenoidosa* gerou peptídeos com atividade antioxidante, pois ao comparar os resultados da microalga não hidrolisada com os ensaios hidrolisados, para todos os métodos estudados, houve aumento da atividade antioxidante, sendo esta diferença significativa ao nível 95%.

Agências de Fomento: Capes, CNPq, Rede Nanofotobiotec.

REFERÊNCIAS

- GOIRIS, K.; MUYLAERT, K.; DE COOMAN, L. **Handbook of Marine Microalgae**. [s.l.] Elsevier, 2015.
- GÜLÇİN, İ. Antioxidant activity of food constituents: an overview. **Archives of Toxicology**, v. 86, p. 345–391, 2012.
- HOYLE, N.; MERRITT, J. H. Quality of fish protein hydrolysate from herring (*Clupea harengus*). **Journal of Food Science**, v.59, p.76–79, 1994.
- MA, C.; NI, X.; CHI, Z.; MA, L.; GAO, L. Purification and Characterization of an alkaline protease from the Marine Yeast *Aureobasidium pullulans* for Bioactive Peptide Production from Different Sources. **Marine Biotechnology**, v. 9, p. 343-351, 2007.
- MOOSMAN, B.; BEHL, C. Secretory peptide hormones are biochemical antioxidants: structure activity relationship. **Molecular Pharmacology**, v. 61, p. 260-268, 2002.
- NGO, D.; QIAN, Z.; RYU, B.; PARK, J. W.; KIM, S. In vitro antioxidant activity of a peptide isolated from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) scale gelatin in free radical-mediated oxidative systems. **Journal of Functional Foods**, v. 2, p. 107–117, 2010.
- OYAIZU, M. Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. **Japanese Journal of Nutrition**, v. 44, p. 307–315, 1986.
- RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS⁺. **EMBRAPA: Comunicado técnico 128** – on line. . Fortaleza, Brasil, 2007a.
- RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **EMBRAPA: Comunicado técnico 127** – on line. Fortaleza, Brasil, 2007b.
- SAFI, C.; ZEBIB, B.; MERAH, O.; PONTALIER, P.-Y.; VACA-GARCIA, C. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 35, p. 265–278, 2014.
- SARMADI, B. H.; ISMAIL, A. Antioxidative peptides from food proteins: **A review. Peptides**, v. 31, p. 1949–1956, 2010.