



# AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE PEPTÍDEOS DE CAMARÃO BRANCO (*Litopenaeus vannamei*)

J.M. Latorres<sup>1</sup>, C.C. Quadros<sup>2</sup>, C. Prentice<sup>3</sup> (*In memoriam*)

1,2,3- Escola de Química e Alimentos - Universidade Federal do Rio Grande, Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos - CEP: 96203-900 – Rio Grande – RS – Brasil, Telefone: (53) 3233-6969 - Fax: (53) 3233-6869 – e-mail: 1-(julatorres@yahoo.com.br); 2 - (camilah@ymail.com); 3 – (dqmprent@furg.br).

**RESUMO** – O objetivo do trabalho foi avaliar o potencial antioxidante de peptídeos de camarão branco (*Litopenaeus vannamei*). Para tanto, hidrolisados proteicos do músculo de camarão branco, com grau de hidrólise de 10 e 20%, foram obtidos utilizando as proteases Alcalase e Protamex e foram fracionados utilizando membranas de ultrafiltração com tamanho de 10 e 3 kDa. Os resultados demonstraram que a propriedade antioxidante apresentada pelos peptídeos foi influenciada pela massa molecular, peptídeos com tamanho inferior a 3 kDa apresentaram elevada capacidade de sequestro do radical DPPH, enquanto que as frações peptídicas com tamanho maior que 10 kDa apresentaram maior poder redutor. Entretanto, para captura do radical ABTS foram observadas elevada capacidade antioxidante para ambas as frações. Diante disso, os peptídeos de camarão branco como uma fonte de antioxidantes naturais que podem ser utilizados como aditivos bioativos no processamento de alimentos.

**ABSTRACT** – The objective of the work was to evaluate the antioxidant potential of peptides of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). For this purpose, protein hydrolysates of the white shrimp muscle, with a degree of hydrolysis of 10 and 20%, obtained using the proteases Alcalase and Protamex, were fractionated using ultrafiltration membranes with sizes of 10 and 3 kDa. The results showed that the antioxidant property shown by the peptides was influenced by the molecular mass, peptides with a size less than 3 kDa showed a high capacity to sequester the DPPH radical, while the peptide fractions with a size greater than 10 kDa had greater reducing power. However, to capture the ABTS radical, high antioxidant capacity was observed for both fractions. Therefore, white shrimp peptides as a source of natural antioxidants that can be used as bioactive additives in food processing.

**PALAVRAS-CHAVE:** bioatividade; crustáceo; ultrafiltração; massa molecular.

**KEYWORDS:** bioactivity; crustacean; ultrafiltration; molecular weight.

## 1. INTRODUÇÃO

A oxidação lipídica, o estresse oxidativo e os compostos antioxidantes são temas recorrentes de diversas pesquisas (Cipolari et al. 2020). Acredita-se que o excesso de radicais livres no organismo pode causar doenças graves (Jang et al. 2016). Além disso, sabe-se que a oxidação lipídica é uma das principais causas de perda de qualidade e degradação de nutrientes durante a preparação, armazenamento e digestão gastrointestinal dos alimentos. Assim, muitos antioxidantes sintéticos, como o hidroxianisol butilado (BHA), o hidroxitolueno butilado (BHT), são usados pela indústria de alimentos e farmacêutica para prevenir, retardar ou inibir a oxidação lipídica (Hu et al. 2020). Entretanto, as pesquisas apontam a crescente demanda por antioxidantes naturais, dado que os compostos sintéticos ocasionam diferentes efeitos adversos ao organismo (Intarasirisawat et al. 2013).



Os peptídeos bioativos são fragmentos de proteínas que podem exercer efeitos benéficos ao organismo humano, quando liberados através de processos de quebra da estrutura da proteína pelas enzimas digestivas durante o trato gastrointestinal ou durante o processamento de alimentos ou por hidrólise, utilizando enzimas comerciais (Chalamaiah et al. 2018). A hidrólise enzimática tem sido amplamente estudada como uma alternativa eficaz para obtenção de peptídeos bioativos, capazes de desempenhar diversas atividades biológicas (Cipolari et al. 2020). Dentre as atividades estudadas, a capacidade antioxidante é uma das propriedades biológicas mais exploradas. Alguns autores indicam que as propriedades biológicas apresentadas pelos peptídeos podem ser melhoradas quando submetidos a processos adicionais de fracionamento após a hidrólise proteica, de modo que esses sistemas resultam em produtos com maior funcionalidade ou maior valor nutricional através de uma forma mais purificada (Abejón et al. 2018).

Entre as fontes proteicas que podem ser utilizadas para a obtenção de peptídeos antioxidantes, as espécies marinhas representam uma fonte valiosa para obtenção de compostos bioativos de fonte natural. A biodiversidade do ambiente e a diversidade química associada constituem um recurso praticamente ilimitado de novas substâncias ativas para a área de desenvolvimento de produtos bioativos (Jemil et al. 2014). Nesse sentido, o objetivo do trabalho foi obter peptídeos antioxidantes a partir do músculo da espécie camarão branco (*Litopenaeus vannamei*).

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material

A matéria-prima utilizada foi o camarão branco (*Litopenaeus vannamei*), obtida a partir dos tanques de cultivo pertencentes à Estação Marinha de Aquicultura (EMA) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil. As enzimas utilizadas no processo de hidrólise foram: Alcalase 2.4 L (endopeptidase bacteriana produzida pelo *Bacillus licheniformis*) e Protamex (1,5 AU/g) (mistura de exo e endopeptidases bacterianas, produzida a partir do *Bacillus subtilis*), obtidas através de doação pela Novozymes Latina Americana Ltda (Araucária PR, Brasil) e adquirida da Sigma Aldrich (St Louis MO, EUA), respectivamente. Os demais reagentes utilizados, foram de grau analítico (P.A.).

### 2.2 Produção dos hidrolisados proteicos de *L. vannamei*

A hidrólise enzimática das proteínas do músculo do camarão branco foi realizada pela adição das enzimas Alcalase e Protamex, conforme metodologia descrita por (Latorres et al. 2018). Resumidamente, o músculo do camarão branco foi homogeneizado em água destilada na proporção 1:2, e o processo de hidrólise ocorreu em um reator de parede de vidro termostaticado sob condições ótimas de temperatura e pH para cada enzima, em separado. O grau de hidrólise (GH) foi monitorado até que atingisse GH de 10 e 20%, de acordo com (Adler-Nissen, 1986). Quando o grau de hidrólise foi atingido, a reação foi interrompida pelo aquecimento a 90°C durante 20 min. Em seguida, a mistura resultante foi arrefecida à temperatura ambiente e centrifugada a 14.000 x g durante 20 min a 4 °C. O sobrenadante foi coletado, ultracongelado, liofilizado e armazenado a -18 °C.

### 2.3 Sistema de ultrafiltração

Os peptídeos de camarão branco foram obtidos através do sistema de ultrafiltração, utilizando membranas de celulose regenerada com 76 mm de diâmetro e massa molar de corte de 10 kDa e 3 kDa, segundo metodologia descrita por Centenaro et al. (2014). As frações obtidas foram divididas em três grupos: F1 (>10 kDa), F2 (3-10 kDa) e F3 (<3 kDa). Todas as frações foram ultracongeladas, liofilizadas, e armazenadas à temperatura de -18 °C para posteriores análises.

### 2.4 Propriedade antioxidante



A avaliação da atividade antioxidante dos peptídeos de camarão branco foi realizada para as três frações peptídicas (F1: >10 kDa, F2: 3-10 kDa e F3: <3 kDa), mediante três métodos: capacidade de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) (Cheng et al. 2006), poder redutor (Zhang et al. 2008), capacidade de sequestro do radical 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS) (Chi et al. 2015). As concentrações testadas foram: 2,5; 5,0 e 7,5 mg.mL<sup>-1</sup> de peptídeo.

## 2.5 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada segundo software Estatística 7.0, nos módulos de análise de variância (ANOVA) e teste de comparação de médias de Tukey ao nível de 5% de significância ( $p < 0,05$ ).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

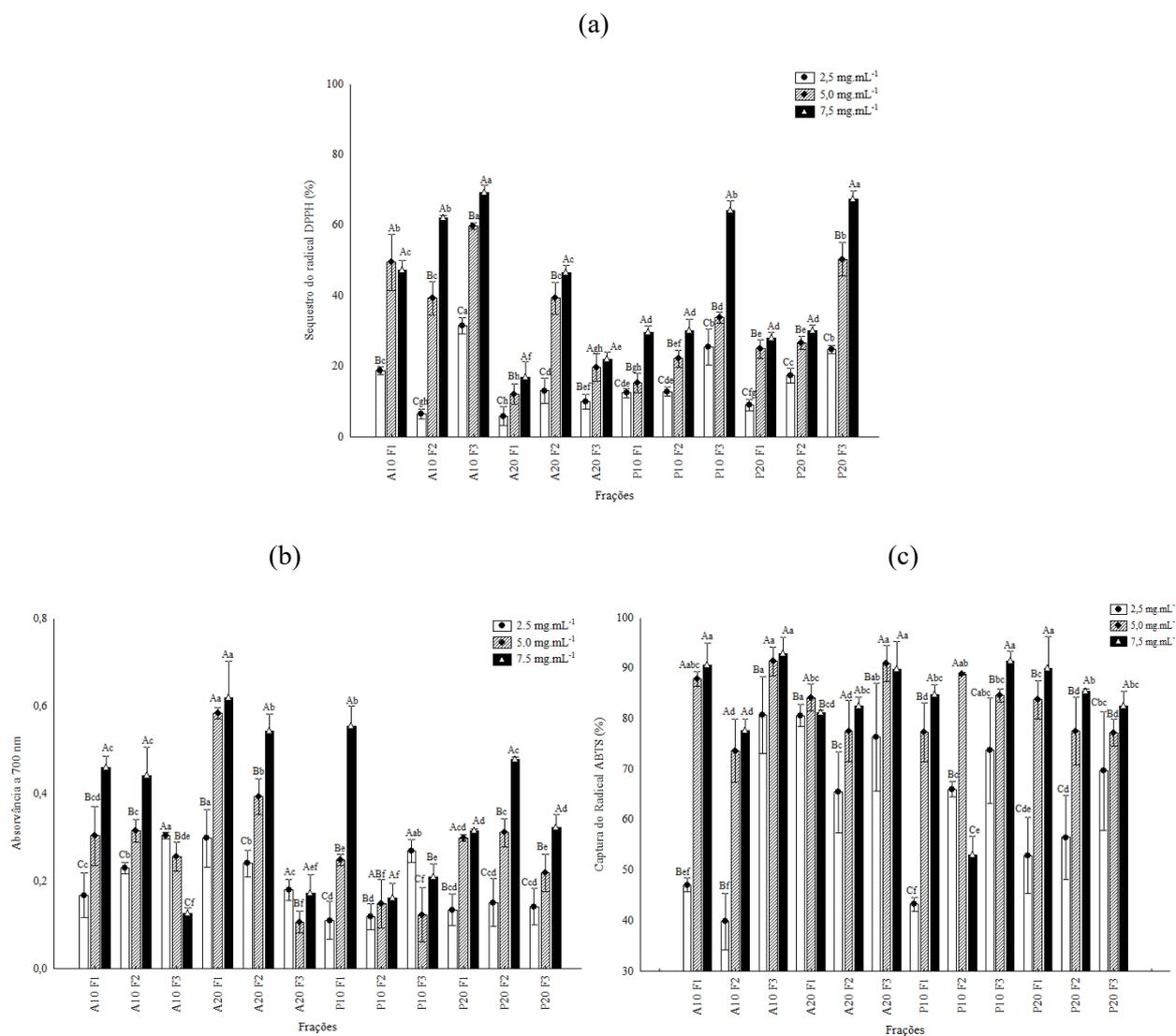
As propriedades antioxidantes dos peptídeos são avaliadas através de uma variedade de métodos. Entre os diferentes métodos, geralmente são utilizados aqueles que avaliam a capacidade de compostos antioxidantes para eliminar os radicais livres e o poder de redução férrica. A literatura não indica um método padrão, embora haja vários métodos conhecidos (Borawska et al. 2016). Assim, a atividade antioxidante apresentada pelas frações peptídicas foi avaliada através de diferentes métodos. De acordo com a Figura 1 (a), a capacidade de sequestro do radical DPPH foi influenciada pelo tamanho molecular dos peptídeos, sabendo que quanto maior a atividade de sequestro do radical, maior será a sua atividade antioxidante. Os peptídeos apresentaram comportamento dose dependente, onde de maneira geral, um acréscimo na concentração permitiu uma maior capacidade antioxidante de sequestro do radical DPPH pelas frações. Ainda, observando os resultados da Figura 1 (a), percebe-se que as frações com menor massa molecular (F3 <3 kDa) apresentaram maior atividade antioxidante para todas as amostras, com exceção da fração peptídica com massa molecular entre 3-10 kDa e GH de 20% utilizando Alcalase (A20F2).

Com relação ao método que quantifica o poder redutor de um composto (Figura 1 (b)), foi possível verificar que ao contrário dos resultados encontrados pelo método de DPPH, reportados na Figura 1 (a), a fração com maior massa molecular A20F1 foi a que apresentou maior poder antioxidante, uma vez que apresentou maior absorvância a 700 nm. Esses resultados sugerem que quanto maior a massa molecular, maior conteúdo de peptídeos doadores de elétrons ou hidrogênio e, conseqüentemente, maior o poder redutor apresentado pelo peptídeo. Comportamento semelhante foi relatado por Luo et al. (2018) que verificaram que os peptídeos com massa molecular >10 kDa provenientes de caracóis marinhos (*Rapana venosa*) apresentaram maior poder de redução férrica.

Analisando a Figura 1 (c), percebeu-se que os resultados encontrados revelaram que para maior concentração (7,5 mg.mL<sup>-1</sup>), as frações A10F1, A10F3, A20F3, P10F3 e P20F1 apresentaram maior atividade antioxidante, a julgar pela maior porcentagem de captura do radical ABTS. Os resultados indicam que as frações F2, com massa molecular entre 3-10kDa apresentaram reduzida atividade quando comparada as faixas F1 e F3, com massa molecular >10 kda e <3kda, respectivamente. Dessa forma, pode-se verificar que a atividade antioxidante pelo método de ABTS foi influenciada de certa forma pelo tamanho, independente do GH ou tipo de enzima utilizada no processo de hidrólise. De acordo com Suwal et al. (2018), o potencial antioxidante dos peptídeos é influenciado pela composição e seqüência de aminoácidos, massa molecular e hidrofobicidade das frações peptídicas. O radical ABTS<sup>+</sup> é solúvel em água e solventes orgânicos, utilizado tanto para determinação da capacidade antioxidante compostos hidrofílicos ou lipofílicos. Dessa forma, observando os resultados encontrados na Figura 1 (c), as frações de maior atividade antioxidante possivelmente apresentam uma composição de aminoácidos com caráter hidrofílico ou lipofílico, devido a facilidade de interação apresentada com o radical ABTS.

Entre os métodos utilizados para avaliar a atividade antioxidante das frações peptídicas de camarão, o método de ABTS foi o que apresentou maior sensibilidade, a julgar pelos valores elevados de captura. Muitos estudos relataram que o ensaio ABTS é preferível do que outro método para confirmar a atividade antioxidante de peptídeos para diferentes alimentos, devido à sua sensibilidade, estabilidade e facilidade para gerar o radical na forma de ABTS, conforme descrito por Becker et al. (2004) e Zhu et al. (2008).

**Figura 1** – Capacidade de sequestro do radical livre DPPH (%) apresentada pelos peptídeos de camarão branco (*L. vannamei*) (a), Poder redutor apresentada pelos peptídeos de camarão branco (*L. vannamei*) (b), Capacidade de sequestro do radical ABTS apresentada pelos peptídeos de camarão branco (*L. vannamei*) (c).



A10F1: Fração peptídica (> 10kDa) de camarão com GH de 10% utilizando Alcalase, A10F2: Fração peptídica (3-10kDa) de camarão com GH de 10% utilizando Alcalase, A10F3: Fração peptídica (< 3kDa) de camarão com GH de 10% utilizando Alcalase, A20F1: Fração peptídica (> 10kDa) de camarão com GH de 20% utilizando Alcalase, A20F2: Fração peptídica (3-10kDa) de camarão com GH de 20% utilizando Alcalase, A20F3: : Fração peptídica (< 3kDa) de camarão com GH de 20% utilizando Alcalase, P10F1: Fração peptídica (>10kDa) de camarão com GH de 10% utilizando Protamex, P10F2: Fração peptídica (3-10kDa) de camarão com GH de 10% utilizando Protamex, P10F3: Fração peptídica (<3kDa) de camarão com GH de 10% utilizando Protamex, P20F1: Fração peptídica (> 10kDa) de camarão com GH de 20% utilizando Protamex, P20F2: Fração peptídica (3-10kDa) de camarão com GH de 20% utilizando Protamex, P20F3: Fração peptídica (<3kDa) de camarão com GH de 20% utilizando Protamex. Letras maiúsculas iguais para mesma fração, indicam que não há diferença significativa entre as concentrações ( $p > 0,05$ ); Letras minúsculas iguais para a mesma concentração, indicam que não há diferença significativa entre as frações ( $p > 0,05$ ).

## 4. CONCLUSÃO

Os resultados encontrados indicam que a produção de peptídeos bioativos por hidrólise enzimática de proteínas de camarão branco é uma alternativa eficaz para obter compostos de elevada atividade antioxidante.

## 5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelas bolsas concedidas. À Estação Marinha de Aquicultura da Universidade Federal do Rio Grande pelas doações das matérias-primas.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abejón, R., Belleville, M. P., Sanchez-Marcano, J., Garea, A. & Irabien, A. (2018). Optimal design of industrial scale continuous process for fractionation by membrane technologies of protein hydrolysate derived from fish wastes. *Separation and Purification Technology*, 197, 137-146.
- Adler-Nissen, J. (1986) *Enzymic hydrolysis of food proteins*. London: Elsevier Applied Science Publishers.
- Becker, E. M., NISSEN, L. R. & SKIBSTED, L. H. (2004). Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. *European Food Research and Technology*, 219, 561-571.
- Borawska, J., Darewicz, M., Vegarud, G. E. & Minkiewicz, P. (2016). Antioxidant properties of carp (*Cyprinus carpio L.*) protein ex vivo and in vitro hydrolysates. *Food Chemistry*, 194, 770 -779.
- Centenaro, G. S., Salas-Mellado, M., Pires, C., Batista, I., Nunes, M. L. & Prentice, C. (2014). Fractionation of protein hydrolysates of fish and chicken using membrane ultrafiltration: Investigation of antioxidant activity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172, 2877 - 2893.
- Chalamaiah, M., Yu, W. & Wu, J. (2018). Immunomodulatory and anticancer protein hydrolysates (peptides) from food proteins: A review. *Food Chemistry*, 245, 205 - 222.
- Cheng, Z., Moore, J. & Yu, L. (2006). High-throughput relative DPPH radical scavenging capacity assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 7429 – 7436.
- Chi, C. F., Hu, F. Y., Wang, B., Li, T. & Ding, G. F. (2015). Antioxidant and anticancer peptides from the protein hydrolysate of blood clam (*Tegillarca granosa*) muscle. *Journal of Functional Foods*, 15, 301 - 313.
- Cipolari, O. C., DE OLIVEIRA NETO, X. A. & CONCEIÇÃO, K. Fish bioactive peptides: A systematic review focused on sting and skin. *Aquaculture*, v. 515, n. October 2019, p. 734598, 2020.
- Hu, X., Yang, X., Wang, T., Li, L., Wu, Y., Zhou, Y. & You, L. (2020) Purification and identification of antioxidant peptides from round scad (*Decapterus maruadsi*) hydrolysates by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. *Food and Chemical Toxicology*, 135, 110882.
- Intarasirisawat, R., Benjakul, S., Wu, J. & Visessanguan, W. (2013). Isolation of antioxidative and ACE inhibitory peptides from protein hydrolysate of skipjack (*Katsuwana pelamis*) roe. *Journal of Functional Foods*, 5, 1854 - 1862.
- Jang, H. L., Liceaga, A. M. & Yoon, K. Y. (2016). Purification, characterization and stability of an antioxidant peptide derived from sandfish (*Arctoscopus japonicus*) protein hydrolysates. *Journal of Functional Foods*, 20, 433 - 442.
- Jemil, I., Jridi, M., Nasri, R., Ktari, N., SALEM, R. B. S., Mehiri, M., Hajji, M. & Nasri, M. (2014). Functional, antioxidant and antibacterial properties of protein hydrolysates prepared from fish meat fermented by *Bacillus subtilis* A26. *Process Biochemistry*, 49, 963 - 972.
- Latorres, J. M., Rios, D. G., Saggiomo, G., Wasielesky, W. & Prentice-Hernandez, C. (2018). Functional and antioxidant properties of protein hydrolysates obtained from white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Journal of*



*Food Science and Technology*, 55, 1 - 9.

Luo, F., Xing, R., Wang, X., Yang, H. & Li, P. (2018). Antioxidant activities of *Rapana venosa* meat and visceral mass during simulated gastrointestinal digestion and their membrane ultrafiltration fractions. *International Journal of Food Science & Technology*, 53, 395 - 403.

Suwal, S., Ketnawa, S., Liceaga, A. M., Huang, J. Y. (2018). Electro-membrane fractionation of antioxidant peptides from protein hydrolysates of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) byproducts. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 45, 122 - 131.

Zhang, S. B., Wang, Z., Xu, S. Y. (2008) Antioxidant and antithrombotic activities of rapeseed peptides. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 85, 521 - 527.

Zhu, L., Jie, C., Tang, X., & Xiong, Y. L. (2008). Reducing, radical scavenging, and chelation properties of in vitro digests of alcalase-treated zein hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 2714 - 2721.