

# Como a maceração enzimática afeta as propriedades antioxidantes de frutos nativos?

## Um estudo de caso utilizando a seriguela

Palavras-Chave: *Spondias purpurea* L.; hidrólise enzimática; compostos fenólicos.

Autores:

Pedro Luis Rossetto Fernandes da Silva; Mariana de Oliveira da Silva [FEA - UNICAMP]

Prof. Dr. Ruann Janser Soares de Castro (orientador) [FEA - UNICAMP]

---

### INTRODUÇÃO

O Brasil possui cerca de 20% da flora mundial, o que corresponde a mais de 40.000 espécies vegetais ricas em fitoquímicos. Por conta dessa diversidade, o país apresenta alto potencial para explorar e produzir novos produtos com alto valor agregado, como nutracêuticos, cosméticos e aditivos alimentares (CARVALHO; CONTE-JÚNIOR, 2021).

A região Nordeste é composta por diferentes biomas como a Floresta Amazônica, Mata Atlântica, Cerrado e Caatinga. A fruticultura nessa região representa uma atividade econômica promissora devido à sua enorme diversificação, e o consumo de frutas tem aumentado, pois, além do seu valor nutricional, essas frutas são ricas em compostos bioativos (DUTRA et al. 2017; SUN et al., 2020). No entanto, algumas espécies de frutas, como a seriguela (*Spondias purpurea* L.) e a mangaba (*Hancornia speciosa*) ainda são pouco exploradas comercialmente.

A *Spondia purpurea* L. é uma árvore tropical nativa das Américas do Sul e Central responsável pela produção dos frutos pequenos de forma ovoide, com coloração que varia do verde ao amarelo e apresentam polpa aromática com sabor agridoce conhecidos como seriguela. Estes frutos são reportados como fontes naturais de compostos bioativos (taninos, ácidos fenólicos e flavonoides) (OMENA et al., 2012; SILVA et al., 2016), os quais estão fortemente associados a múltiplos benefícios à saúde, exibindo propriedades antioxidantes, anti-inflamatória, antidiabética e antimicrobiana (HU et al., 2019; CASTALDO et al., 2020).

A modificação de matrizes vegetais por meio de processos biotecnológicos, em especial os que envolvem a aplicação de enzimas, tem demonstrado efeitos promissores, resultando na melhoria de propriedades nutricionais, biológicas e funcionais dessas matrizes. O tratamento enzimático ou maceração enzimática de frutos é aplicada com a finalidade de hidrolisar as cadeias polissacarídicas da parede celular vegetal. Essa tecnologia faz uso de pectinases, celulasas, proteases, dentre outras enzimas, as quais atuam aumentando a solubilização do tecido vegetal, resultando em maior rendimento de suco e na maior extração de pigmentos e de compostos bioativos (AZMIR et al., 2013).

No sentido de associar um fruto nativo do bioma brasileiro pouco explorado e uma tecnologia eficiente, segura e ambientalmente amigável em uma abordagem ainda não reportada na literatura, a presente proposta de trabalho visou responder a seguinte questão: como a maceração enzimática afeta as propriedades antioxidantes de polpa de seriguela?

## MATERIAL E MÉTODOS

Os efeitos do tratamento enzimático sobre o conteúdo de compostos fenólicos e da capacidade antioxidante da polpa de seriguela foram avaliados mediante a aplicação das enzimas Celluclast® 1.5L, Viscozyme® L e Pectinex® Ultra SP-L (Novozymes). As condições de ensaio foram definidas de acordo com as recomendações do fabricante. Os parâmetros utilizados foram a adição de diferentes concentrações da enzima (0,25 e 0,50% v:m) e a avaliação de diferentes tempos de reação (30, 60 e 120 min). A polpa sem aplicação de tratamento foi utilizada como controle. Os ensaios foram conduzidos sob agitação de 100 rpm, temperatura de 40°C e pH da polpa foi ajustado com tampão acetato (100 mmol/L, pH 5,0). O detalhamento das combinações destas variáveis é apresentado na Tabela 1. As polpas foram analisadas quanto ao teor de compostos fenólicos totais (expressos em mg de ácido gálico equivalente por g de amostra – AGE/g) (PEREIRA; ARRUDA; PASTORE, 2017) e capacidade antioxidante mensurada pelos métodos ABTS (AL-DUAIS, et al. 2009), DPPH (AL-DUAIS, et al. 2009) e FRAP (FIRUZI, et al. 2005) (expressa em  $\mu\text{mol}$  de Trolox equivalentes por g de amostra -  $\mu\text{mol TE/g}$ ).

**Tabela 1.** Condições de ensaio utilizadas durante o tratamento enzimático da polpa de seriguela utilizando diferentes preparações enzimáticas e concentrações.

Ensaio	Duração (min)	Concentração de enzima (%)
Controle	0	0,00
1	30	0,25
2	30	0,50
3	60	0,25
4	60	0,50
5	120	0,25
6	120	0,50

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos em função do tempo de reação, da concentração e da preparação enzimática utilizada variaram sensivelmente quando avaliados os teores de compostos bioativos (fenólicos totais, ) e as propriedades antioxidantes (ABTS, DPPH e FRAP) para a polpa de seriguela (Tabela 2). De forma geral, o tratamento enzimático, independente da preparação utilizada, afetou positivamente a polpa de seriguela, resultando em aumento da concentração de compostos fenólicos e da atividade antioxidante.

Para os tratamentos conduzidos com a enzima Celluclast® 1.5L, os maiores destaques foram: i) 39,54  $\mu\text{mol TE/g}$  para o método ABTS (polpa tratada durante 120 minutos com 0,25% da enzima - ensaio 5); ii) 49,25  $\mu\text{mol TE/g}$  para a capacidade de redução dos radicais DPPH (polpa tratada durante 60 minutos com 0,5% de enzima – ensaio 4) e iii) 51,00  $\mu\text{mol TE/g}$  para o método FRAP (polpa tratada durante 60 minutos com 0,25% de enzima - ensaio 3). A enzima Celluclast 1.5L contém predominantemente celulasas (endo-glucanases), responsáveis pela hidrólise de materiais celulósicos nas paredes celulares vegetais liberando oligossacarídeos, celobiose e glicose, além de outros compostos complexados a essas estruturas.

Para os tratamentos conduzidos com a enzima Viscozyme® L, os maiores destaques foram obtidos quando a polpa foi tratada durante 30 minutos com 0,25% da enzima (ensaio 1), como segue: i) 79,70  $\mu\text{mol TE/g}$  para o método ABTS; ii) 18,54  $\mu\text{mol TE/g}$  para a capacidade de redução dos radicais DPPH e iii) 48,50  $\mu\text{mol TE/g}$  para o método FRAP. A Viscozyme® L é um complexo enzimático composto por diversos tipos de carboidrases (beta-glucanases, pectinases, hemicelulasas e xilanasas) e pode efetivamente hidrolisar ligações dentro da matriz polissacarídica da parede celular vegetal, liberando os compostos fenólicos, os quais podem estar intimamente ligados ao aumento da atividade antioxidante.

A utilização da enzima Pectinex® Ultra SP-L no tratamento enzimático resultou nos seguintes destaques: i) 56,04 µmol TE/g para o método ABTS (polpa tratada durante 60 minutos com 0,5% da enzima - ensaio 4); ii) 43,23 µmol TE/g para a capacidade de redução dos radicais DPPH (polpa tratada durante 60 minutos com 0,25% de enzima – ensaio 3) e iii) 42,57 µmol TE/g para o método FRAP (polpa tratada durante 60 minutos com 0,25% de enzima - ensaio 3). Assim como a preparação enzimática Viscozyme, a Pectinex® Ultra SP-L é uma mistura de pectinases, hemicelulases e beta-glucanases intensamente aplicada na indústria de alimentos para tratamento de matrizes vegetais, especialmente na extração de sucos.

O teor de compostos fenólicos apresentou aumento considerável após os tratamentos enzimáticos, o que é fortemente correlacionável com os incrementos de atividade antioxidante detectados para os métodos ABTS, DPPH e FRAP.

**Tabela 2.** Valores da capacidade antioxidante da polpa de seriguela (*Spondia purpurea* L.) antes e após o tratamento enzimático com as enzimas Celluclast® 1.5L, Viscozyme® L e Pectinex® Ultra SP-L.

<i>Tratamento com Celluclast® 1.5L</i>								
Ensaio	Fenólicos totais (mg AGE/g)	Δ (%)	ABTS (µmol TE/g)	Δ (%)	DPPH (µmol TE/g)	Δ (%)	FRAP (µmol TE/g)	Δ (%)
Controle	1,60 ± 0,03	-	15,79 ± 1,40	-	12,87 ± 0,78	-	14,28 ± 0,11	-
1	4,41 ± 0,14	176%	30,58 ± 1,86	94%	19,44 ± 2,07	51%	50,08 ± 2,24	251%
2	4,99 ± 0,40	212%	32,95 ± 1,39	109%	37,99 ± 2,96	195%	42,50 ± 1,44	198%
3	3,51 ± 0,12	119%	30,14 ± 4,17	91%	27,68 ± 2,91	115%	51,00 ± 2,12	257%
4	3,77 ± 0,23	136%	30,20 ± 6,11	91%	49,25 ± 1,72	283%	42,00 ± 0,66	194%
5	4,08 ± 0,09	155%	39,54 ± 2,80	150%	22,73 ± 2,01	77%	23,18 ± 3,32	62%
6	3,91 ± 0,14	144%	30,98 ± 0,83	96%	35,44 ± 3,53	175%	23,20 ± 2,54	62%
<i>Tratamento com Viscozyme® L</i>								
Ensaio	Fenólicos totais (mg AGE/g)	Δ (%)	ABTS (µmol TE/g)	Δ (%)	DPPH (µmol TE/g)	Δ (%)	FRAP (µmol TE/g)	Δ (%)
Controle	2,24 ± 0,17	-	26,83 ± 5,55	-	16,68 ± 1,27	-	20,28 ± 0,21	-
1	3,89 ± 0,41	74%	79,70 ± 1,69	197%	18,54 ± 1,42	11%	48,50 ± 2,16	139%
2	4,13 ± 0,08	84%	64,98 ± 3,11	142%	9,54 ± 0,40	-43%	30,14 ± 1,64	49%
3	3,71 ± 0,39	66%	51,76 ± 2,10	93%	9,87 ± 1,40	-41%	30,23 ± 1,46	49%
4	4,12 ± 0,11	84%	54,48 ± 3,37	103%	17,73 ± 7,39	6%	35,15 ± 1,75	73%
5	4,34 ± 0,15	94%	53,08 ± 0,25	98%	15,97 ± 3,88	-4%	43,21 ± 2,42	113%
6	4,20 ± 0,40	88%	49,14 ± 1,35	83%	13,20 ± 5,40	-21%	32,85 ± 0,50	62%
<i>Tratamento com Pectinex Ultra SP-L</i>								
Ensaio	Fenólicos totais (mg AGE/g)	Δ (%)	ABTS (µmol TE/g)	Δ (%)	DPPH (µmol TE/g)	Δ (%)	FRAP (µmol TE/g)	Δ (%)
Controle	0,61 ± 0,05	-	26,98 ± 2,27	-	22,44 ± 3,49	-	5,83 ± 0,05	-
1	8,34 ± 0,04	1267%	42,76 ± 1,26	58%	31,94 ± 1,96	42%	29,35 ± 1,41	403%
2	4,40 ± 0,14	621%	43,01 ± 1,88	59%	33,54 ± 1,80	49%	29,42 ± 0,91	405%
3	7,17 ± 2,56	1075%	56,01 ± 1,94	108%	43,23 ± 3,25	93%	42,57 ± 2,28	630%
4	2,10 ± 0,21	244%	56,04 ± 0,90	108%	34,23 ± 0,87	53%	17,73 ± 2,48	204%
5	11,30 ± 1,16	1752%	35,70 ± 2,69	32%	38,68 ± 1,26	72%	37,25 ± 1,33	539%
6	7,23 ± 0,08	1085%	47,83 ± 1,38	77%	39,54 ± 0,48	76%	21,93 ± 1,10	276%

A parede celular vegetal consiste em uma matriz bem organizada de carboidratos (celulose, hemicelulose e pectina) composta por ligações açúcar-álcoois. A maioria dos compostos bioativos está contida nos polissacarídeos da parede celular por pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas com os polissacarídeos ou ainda por ligações éter entre proteínas e carboidratos (MARATHE et al., 2019; PATIL et al., 2021).

A aplicação do tratamento enzimático tem sido considerada uma boa estratégia para melhorar a extração de compostos fenólicos nos alimentos (ARAÚJO et al. 2019). As enzimas, tais como pectinases, celulases e proteases, quando empregadas na extração, de compostos bioativos de origem natural, atuam hidrolisando componentes da parede celular vegetal facilitando a liberação de compostos insolúveis que estão complexados com macronutrientes, como as proteínas e os carboidratos, o que conseqüentemente, resulta em aumento das propriedades biológicas das matrizes (ALARA; ABDURAHMAN; UKAEGBU, 2021).

Granato et al., (2022) estudaram os efeitos de diferentes enzimas comerciais (pectinases, celulases, beta-1-3-glucanases e pectina liases) na recuperação de polifenóis de torta de groselha. Os resultados obtidos mostraram que a  $\beta$ -glucanase permitiu a recuperação do maior teor de fenólicos totais, atingindo 11,42 mg/g; valor semelhante ao obtido quando a polpa de seriguela foi tratada com 0,25% de Pectinex durante 120 minutos (11,30 mg AGE/g). Os autores ainda observaram que o uso de celulases e pectinases potencializou a extração de antioxidantes.

## **CONCLUSÃO**

A partir das avaliações realizadas foi possível demonstrar que a maceração enzimática foi efetiva no tratamento da polpa de seriguela, o que resultou em maior extração de compostos fenólicos e aumento de suas propriedades antioxidantes. Os resultados obtidos oferecem uma oportunidade de processo que pode ser aplicado industrialmente para melhoria de propriedades funcionais de frutos nativos pouco explorados comercialmente.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao CNPq/PIBIC e à Pró-Reitoria de Pesquisa (PRP) da Unicamp pela bolsa de iniciação científica e a todos os membros do Laboratório de Bioquímica de Alimentos, que sempre se mostraram solícitos e gentis. Em especial à discente de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Mariana de Oliveira da Silva e ao Professor Doutor Ruann Janser Soares de Castro, por toda ajuda, ensinamentos e conselhos durante o desenvolvimento desse projeto.

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALARA, O. R.; ABDURAHMAN, N. H.; UKAEGBU, C. I. Extraction of phenolic compounds: A review. **Current Research Food Science**, v. 4, p. 200–214, 2021.
- AL-DUAIS, M.; MÜLLER, L.; BÖHM, V.; JETSCHKE, G. Antioxidant capacity and total phenolics of *Cyphostemma digitatum* before and after processing: use of different assays. **European Food Research and Technology**, p.228, n.5, p. 813-21, 2009.
- ARAÚJO, N.M.P.; PEREIRA, G.A.; ARRUDA, H.S.; PRADO, L.G.; RUIZ, A.L.T.G.; EBERLIN, M.N.; CASTRO, R.J.S.; PASTORE, G.M. Enzymatic treatment improves the antioxidant and antiproliferative activities of *Adenanthera pavonina* L. seeds. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 18, p. e101002, 2019.
- AZMIR, J.; ZAIDUL, I.S.M.; RAHMAN, M.M.; SHARIF, K.M.; MOHAMED, A.; SAHENA, F.; JAHURUL, M.H.A.; GHAFOOR, K.; NORULAINI, N.A.N.; OAR, A.K.M. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 4, p. 426–436, 2013.
- CARVALHO, A.P.A.; CONTE-JÚNIOR, C.A. Health benefits of phytochemicals from Brazilian native foods and plants: Antioxidant, antimicrobial, anti-cancer, and risk factors of metabolic/endocrine disorders control. **Trends in Food Science & Technology**, v. 111, p.534-548, 2021.
- CASTALDO, L.; NARVÁEZ, A.; IZZO, L.; GRAZIANI, G.; RITIENI, A. In vitro bioaccessibility and antioxidant activity of coffee silverskin polyphenolic extract and characterization of bioactive compounds using UHPLC-Q-Orbitrap HRMS. **Molecules**, v. 25, p. e2132, 2020.
- FIRUZI, O.; LACANNA, A.; PETRUCCI, R.; MARROSU, G.; SASO, L. Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by “ferric reducing antioxidant power” assay and cyclic voltammetry. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1721, p. 174-84, 2005.
- GRANATO, D.; FIDELIS, M.; HAAPAKOSKI, M.; LIMA, A.S.; VIIL, J.; HELLSTRÖM, J.; RÄTSEP, R.; KALDMÄE, H.; BLEIVE, U.; AZEVEDO, L.; MARJOMÄKI, V.; ZHARKOVSKY, A.; PAP, N. Enzyme-assisted extraction of anthocyanins and other phenolic compounds from blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) press cake: From processing to bioactivities, **Food Chemistry**, v. 391, 2022.
- HU, G.L.; WANG, X.; ZHANG, L.; QIU, M.H. The sources and mechanisms of bioactive ingredients in coffee. **Food & Function**, v. 10, p. 3113–3126, 2019
- MARATHE, S.J., JADHAV, S.B., BANKAR, S.B., SINGHAL, R.S., 2017. Enzyme-Assisted Extraction of Bioactives, in: **Food Bioactives: Extraction and Biotechnology Applications**. Elsevier, Austrália, p. 326.
- OMENA, C.M.M.B.; VALENTIM, I.B.; GUEDES, G.S.; RABELO, L.A. et al. Antioxidant, anti-acetylcholinesterase and cytotoxic activities of ethanol extracts of peel, pulp and seeds of exotic brazilian fruits antioxidant, anti-acetylcholinesterase and cytotoxic activities in fruits. **Food Research International**, v. 49, p. 334-344, 2012.
- PATIL, P.D., PATIL, S.P., KELKAR, R.K., PATIL, N.P., PISE, P. V., NADAR, S.S. Enzyme-assisted supercritical fluid extraction: An integral approach to extract bioactive compounds. **Trends in Food Science and Technology**, v. 116, p. 357–369, 2021.
- PEREIRA, G.A.; ARRUDA, H.S.; PASTORE, G.M. Modification and validation of Folin-Ciocalteu assay for faster and safer analysis of total phenolic content in food samples. **Brazilian Journal of Food Research**, v. 9, p. 125-140, 2017.
- SILVA, R.V.; COSTA, S.C.C.; BRANCO, C.R.C.; BRANCO, A. In vitro photoprotective activity of the *Spondias purpurea* L. peel crude extract and its incorporation in a pharmaceutical formulation. **Industrial Crops and Products**, v 83, p. 509-514, 2016.