



Extração assistida por enzimas de compostos com potencial antioxidante e antidiabético de brácteas de bananeira

Isabella Shara Cortez Daccache*, Karen Linelle de Oliveira Santos,
Ruann Janser Soares de Castro

Laboratório de Bioquímica de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Unicamp.

Introdução

A banana (*Musa* sp.) é a fruta in natura mais consumida e apreciada mundialmente, cultivada em mais de 130 países¹. É um fruto de baixo custo e com alto valor nutritivo, sendo produzida principalmente na Ásia, América Latina e África². Devido ao grande volume de produção, toneladas de resíduos da bananicultura (como as brácteas) são descartadas ou utilizadas como adubo orgânico^{3,4}.

As brácteas da bananeira são as inflorescências da banana (Figura 1), popularmente conhecidas como coração, umbigo ou flor da bananeira, e são mais utilizadas na gastronomia em países como Malásia, Taiwan, Índia e Sri Lanka, e no estado brasileiro de Minas Gerais^{4,5}.



Figura 1. Inflorescências da bananeira.

Estudos relataram propriedades medicinais relacionadas às brácteas⁶, as quais podem ser exploradas como fonte de compostos bioativos e de fibras para a alimentação⁷, visto que essas substâncias apresentam benefícios à saúde, como na prevenção e/ou gerenciamento de doenças crônicas e degenerativas⁸.

Com o objetivo de garantir o uso sustentável desse resíduo, o presente trabalho investigou as propriedades antioxidantes e antidiabéticas (inibição da atividade enzimática de α -amilase) de extratos da bráctea da bananeira da variedade Nanica produzidos a partir da extração assistida por enzimas.

Material e Métodos

As brácteas de bananeira da variedade Nanica foram doadas pela empresa Magário, produzidas na cidade de Jaíba-MG e retiradas na Central de Abastecimento de Campinas S.A. (CEASA). As folhas de brácteas foram higienizadas em água corrente, trituradas, congeladas, liofilizadas e armazenadas em embalagens à vácuo na temperatura de -18°C (Figura 2).



Figura 2. Preparação das brácteas de bananeira.

Para a hidrólise enzimática, foram utilizadas as preparações enzimáticas Pectinex XXL (pectinase de *Aspergillus niger*), Flavourzyme 500L (protease de *Aspergillus oryzae*) e Celluclast (celulase de *Trichoderma reesei*).

A proporção e composição das preparações enzimáticas foram determinadas de acordo com um delineamento experimental de misturas (Tabela 1).

Amostras de 0,25 g de brácteas foram incubadas em 25 mL de solução tampão fosfato (100 mmol/L pH 5,0) a 50°C sob agitação de 100 rpm durante 2 horas. Após a incubação, as 10 misturas reacionais e o ensaio controle foram colocados em banho de gelo durante 5 minutos e centrifugados. O sobrenadante de cada amostra foi armazenado e congelado para a execução das análises espectrofotométricas de compostos fenólicos totais⁹, capacidade sequestradora do radical ABTS¹⁰, capacidade de inibição de radicais DPPH¹⁰, poder antioxidante de redução de ferro pelo método FRAP¹¹ e capacidade de absorção do radical oxigênio pelo método ORAC¹². As determinações de compostos fenólicos totais, FRAP, ABTS e ORAC foram conduzidas com amostras na concentração de 2 mg/mL, enquanto a inibição de radicais DPPH foi realizada com amostras na concentração de 1 mg/mL. A análise da capacidade de inibição da enzima α -amilase¹³ foi realizada com amostras na concentração de 10 mg/mL.

Todos os experimentos realizados foram analisados comparativamente com as suas respectivas amostras não tratadas enzimaticamente (controle).

Tabela 1. Matriz do delineamento experimental de misturas para a extração de compostos bioativos de brácteas de bananeira da variedade Nanica utilizando diferentes preparações enzimáticas para o estudo de propriedades antioxidantes e antidiabéticas.

Ensaio	Pectinex (A) (mL)	Flavourzyme (B) (mL)	Celluclast (C) (mL)
1	1 (0,25)	0	0
2	0	1 (0,25)	0
3	0	0	1 (0,25)
4	1/2 (0,125)	1/2 (0,125)	0
5	1/2 (0,125)	0	1/2 (0,125)
6	0	1/2 (0,125)	1/2 (0,125)
7	1/3 (0,083)	1/3 (0,083)	1/3 (0,083)
8	2/3 (0,165)	1/6 (0,042)	1/6 (0,042)
9	1/6 (0,042)	2/3 (0,165)	1/6 (0,042)
10	1/6 (0,042)	1/6 (0,042)	2/3 (0,165)

Para as avaliações estatísticas, o coeficiente de correlação múltipla (R^2) e o teste de Fisher (análise de variância-ANOVA) foram utilizados para verificar a adequação estatística dos modelos propostos codificados aos pontos reais. O software Statistica®13.3 da Statsoft Inc. (Tulsa, Oklahoma, EUA) foi utilizado para o planejamento experimental, análise de dados e construção de modelos. Os resultados também foram analisados estatisticamente pela ANOVA seguida do teste de Tukey utilizando o software Minitab® 19 de Minitab Inc. (State College, Pensilvânia, EUA). Os valores foram expressos como média aritmética e considerados estatisticamente diferentes quando os valores de p foram inferiores a 0,05.

Resultados e Discussão

Os resultados obtidos para cada ensaio do Planejamento Experimental de Misturas (Tabela 2) demonstraram que os extratos apresentaram teor de compostos fenólicos totais variando de 2,03 a 5,99 mg AGE/g. A determinação das propriedades antioxidantes dos extratos resultou em valores variando de 16,02 a 20,62 $\mu\text{mol TE/g}$ para o método FRAP, de 10,63 a 24,10 $\mu\text{mol TE/g}$ para capacidade de inibição de radicais DPPH, de 30,15 a 62,44 $\mu\text{mol TE/g}$ para capacidade sequestradora do radical ABTS e de 11,06 a 31,45 $\mu\text{mol TE/g}$ para o método ORAC. Os extratos produzidos apresentaram baixa capacidade de inibição da enzima α -amilase com valores variando de 2,2 a 6,27% (Tabela 2).

Diante dos resultados obtidos, é possível constatar que as propriedades antioxidantes e o teor de compostos fenólicos foram maiores após o tratamento enzimático, independente da preparação enzimática utilizada para a recuperação de compostos.

Os resultados mais promissores foram detectados no ensaio 9 (Pectinex (1/6), Flavourzyme (2/3) e Celluclast (1/6)), onde aumentos de 680%, 65% e 330% nos teores de compostos fenólicos totais, e nas propriedades antioxidantes mensuradas pelos métodos DPPH e ABTS, respectivamente, em relação ao controle (sem tratamento enzimático) foram observados (Tabela 2).

Tabela 2. Determinação do teor de compostos fenólicos totais (mg AGE/g), das propriedades antioxidantes avaliadas pelos ensaios FRAP, DPPH, ABTS e ORAC ($\mu\text{mol TE/g}$) e da capacidade de inibição de α -amilase de brácteas de banana da variedade Nanica, tratadas utilizando diferentes preparações enzimáticas.

Ensaio	Compostos fenólicos	FRAP	DPPH	ABTS	ORAC	Inibição α -amilase
Unidade	mg AGE/g	$\mu\text{mol TE/g}$	$\mu\text{mol TE/g}$	$\mu\text{mol TE/g}$	$\mu\text{mol TE/g}$	%
Controle	0,77 \pm 0,22 ^d	18,21 \pm 1,23 ^{abc}	14,61 \pm 0,14 ^b	14,54 \pm 0,65 ^f	5,49 \pm 0,49 ^f	4,03 \pm 2,16 ^a
1	2,03 \pm 0,06 ^d	16,02 \pm 0,18 ^c	15,87 \pm 1,47 ^{ab}	34,73 \pm 1,44 ^{de}	11,06 \pm 0,73 ^c	3,83 \pm 1,28 ^a
2	3,76 \pm 0,17 ^c	16,70 \pm 0,72 ^{bc}	16,72 \pm 0,75 ^{bc}	49,16 \pm 0,23 ^{bc}	19,89 \pm 0,03 ^{bc}	3,64 \pm 0,72 ^a
3	4,77 \pm 0,25 ^{abc}	18,30 \pm 2,28 ^{abc}	10,63 \pm 0,75 ^{ab}	30,15 \pm 1,45 ^{ef}	15,70 \pm 0,07 ^{cd}	5,59 \pm 3,48 ^a
4	4,66 \pm 0,04 ^{bc}	17,24 \pm 0,84 ^{abc}	12,62 \pm 2,42 ^b	49,56 \pm 1,37 ^{bc}	20,04 \pm 0,86 ^b	3,83 \pm 1,93 ^a
5	4,28 \pm 0,52 ^c	17,97 \pm 0,33 ^{abc}	14,96 \pm 0,54 ^{ab}	44,94 \pm 1,06 ^{cd}	14,73 \pm 0,69 ^{de}	6,27 \pm 3,56 ^a
6	4,59 \pm 0,17 ^{bc}	16,64 \pm 0,68 ^{bc}	13,08 \pm 0,10 ^{ab}	53,02 \pm 1,89 ^{abc}	31,45 \pm 2,44 ^a	3,62 \pm 0,75 ^a
7	5,00 \pm 0,27 ^{abc}	19,53 \pm 0,35 ^{abc}	14,52 \pm 0,04 ^{ab}	59,73 \pm 2,60 ^{ab}	15,16 \pm 1,01 ^{de}	3,98 \pm 0,56 ^a
8	3,81 \pm 0,36 ^c	17,47 \pm 0,50 ^{abc}	22,02 \pm 3,05 ^{ab}	49,47 \pm 0,90 ^{bc}	19,62 \pm 1,25 ^{bc}	3,44 \pm 0,72 ^a
9	5,99 \pm 0,80 ^a	20,62 \pm 1,18 ^a	24,10 \pm 0,43 ^a	62,44 \pm 4,43 ^a	23,45 \pm 1,76 ^b	2,20 \pm 0,50 ^a
10	5,67 \pm 0,39 ^{ab}	19,85 \pm 1,02 ^{ab}	13,37 \pm 0,51 ^{ab}	51,46 \pm 0,78 ^{bc}	20,32 \pm 0,61 ^b	3,49 \pm 0,34 ^a

Os resultados estão apresentados como média \pm desvio padrão. Letras sobrescritas diferentes em uma mesma coluna indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os resultados, segundo o teste de Tukey.

A capacidade de inibição da enzima α -amilase apresentou o melhor resultado médio no ensaio 5, mas sem diferença significativa ($p > 0,05$) em relação aos demais ensaios e ao controle, indicando que os extratos apresentaram baixo potencial antidiabético nas condições de ensaio avaliadas em nosso estudo.

A partir dos valores experimentais obtidos, modelos quadráticos ou cúbicos foram avaliados quanto ao ajuste às respostas (compostos fenólicos totais, FRAP, DPPH, ABTS, ORAC e capacidade de inibição da enzima α -amilase) utilizando-se o coeficiente de correlação múltipla (R^2) e o teste de Fisher (análise de variância – ANOVA) (Tabela 3).

A ANOVA indicou que os modelos propostos para as respostas de compostos fenólicos totais, ABTS e ORAC forneceram um bom ajuste estatístico, visto que foram capazes de explicar aproximadamente 74%, 98% e 75% da variação total dos resultados, respectivamente, além de apresentar valores de p estatisticamente significativos ($p < 0,05$). Para as demais respostas, os modelos de regressão mostraram valores de R^2 baixos ou p -valores não significativos, indicando que não são adequados para explicação das variações dos resultados.

Curvas de contorno foram geradas para ilustrar os efeitos das variáveis independentes. Para compostos fenólicos totais, foi demonstrado que a combinação binária de Pectinex e Flavourzyme apresentou efeito sinérgico, resultando em valores superiores aos obtidos com estas enzimas de forma isolada. Neste caso, a aplicação de Celluclast isoladamente também incidiu em boa recuperação de compostos fenólicos (Figura 3A). Para ABTS, a combinação ternária das enzimas exerceu um importante efeito sinérgico sobre as propriedades antioxidantes dos extratos das brácteas de banana Nanica (Figura 3B). Para o método ORAC, a combinação binária de Celluclast e Flavourzyme apresentou o efeito sinérgico mais relevante sobre as propriedades antioxidantes dos extratos (Figura 3C).

Tabela 3. Análise de variância (ANOVA) incluindo equações, R^2 e valores de probabilidade dos modelos reduzidos para as determinações de compostos bioativos, capacidade antioxidante e propriedade antidiabética dos hidrolisados de brácteas de banana-nanica.

Respostas	Modelo	Equações	F-calculado	F-tabelado	R^2	P-valor
Compostos fenólicos totais	Quadrático	$Y=2,20A + 4,18B + 5,51C + 7,95AB$	5,67	3,29	0,74	0,035
FRAP	Não válido	-	0,66	3,26	0,15	0,540
DPPH	Não válido	-	1,28	3,26	0,26	0,330
ABTS	Cúbico	$Y=34,18A + 50,10B + 30,25C + 31,25AB + 49,10AC + 55,54BC + 214,21ABC$	24,49	5,28	0,98	0,012
ORAC	Quadrático	$Y= 13,07A + 21,08B + 15,47C + 42,54AB$	5,97	3,29	0,75	0,031
Inibição de α-amilase	Não-válido	-	5,28	1,99	0,80	0,304

Os valores codificados nas equações acima representam os componentes da mistura e suas interações: A = Pectinex, B = Flavourzyme e C = Celluclast.

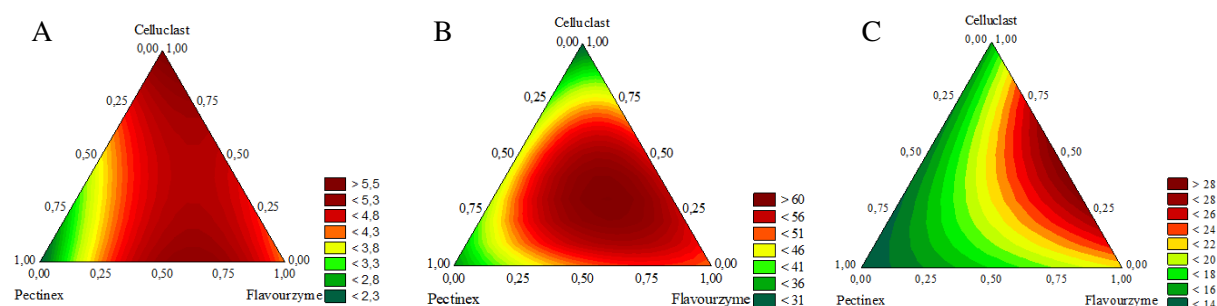


Figura 3. Curvas de contorno geradas para teor de compostos fenólicos totais (A), ABTS (B) e ORAC (C) dos extratos obtidos a partir de brácteas de bananeira da variedade Nanica em função dos componentes (preparações enzimáticas) da mistura com efeitos significativos ($p \leq 0,10$).

A interpretação das curvas de contorno confirmou a análise dos efeitos sinérgicos em que foi demonstrado que a combinação de enzimas resultou em um incremento das propriedades antioxidantes e no teor de compostos fenólicos totais dos extratos.

As brácteas, como matrizes vegetais, possuem paredes celulares ricas em compostos lignocelulósicos como a celulose, que podem estar ligados aos compostos fenólicos¹³. Tais compostos estão disponíveis na forma solúvel e insolúvel. Grande parte dos compostos solúveis estão localizados nos vacúolos das células vegetais enquanto que os fenólicos insolúveis estão localizados na matriz da parede celular¹⁴. Para a liberação destes compostos, as combinações enzimáticas são empregadas pois atuam de formas distintas no substrato.

Para facilitar a recuperação de compostos é importante que a enzima seja capaz de cruzar várias barreiras, sendo a primeira a parede extracelular, constituída por celulose, pectinas, hemiceluloses e arabinogalactanos e, em seguida, a parede celular que contém glicoproteínas¹⁵. Portanto, a diversidade de compostos extraídos é maior quando são utilizadas misturas de enzimas, resultando em aumento das propriedades antioxidantes dos extratos em relação à amostra não hidrolisada (controle).

Conclusão

O tratamento enzimático de brácteas de bananeira da variedade Nanica foi utilizado com êxito para a definição da combinação de enzimas mais adequada para a recuperação de compostos bioativos. Tais análises demonstraram o potencial da bráctea como uma fonte considerável de compostos com propriedades antioxidantes. No entanto, estudos adicionais devem ser realizados para verificar com maior profundidade o potencial antidiabético dos extratos.

Agradecimentos

Agradecimentos ao Programa de Iniciação Científica (PIBIC) da Unicamp, ao CNPQ pela concessão da bolsa de estudos e ao Laboratório de Bioquímica de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp pela oportunidade de desenvolvimento do projeto.

Referências bibliográficas

1. LIMA, M. B.; SILVA, S.O.; FERREIRA, C. F. **Banana: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. 2. ed. Brasília-DF. Embrapa, 2012.
2. FAO. **Statistical Database of the Food and Agriculture Organization of the United Nations**, 2019. Disponível em: <http://www.fao.org/economic/est/estcommodities/bananas/bananafacts/en/#.XFB2plxKjDd>. Acesso em: 29 jan. 2019.
3. FINGOLO, C. E. et al. The natural impact of banana inflorescences (*Musa acuminata*) on human nutrition. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 84, n. 4, p. 891-898, 2012.
4. DA SILVA, A. C. P., SARTORI, G. V., OLIVEIRA, A. L. Composição nutricional do coração da bananeira e sua utilização como um alimento alternativo. **SaBios- Revista de Saúde e Biologia**, v. 9, p.40-45, 2014.
5. WICKRAMARACHCHI, K., RANAMUKHAARACHCHI, S. L. Preservation of Fiber-Rich Banana Blossom as a Dehydrated Vegetable. **Science Asia**, v. 31, p. 265-271, 2005.
6. VINAYKUMAR, T. et al. Reno protective and testicular protective effect of *Musa paradisiaca* flower extract in streptozotocin induced diabetic rats. **Journal of Innovative Trends in Pharmaceutical Sciences**, v. 1, n. 2, p. 106, 2010.
7. SHENG, Z. W. et al. Investigation of dietary fiber, protein, vitamin E and other nutritional compounds of banana flower of two cultivars grown in China. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 25, p. 3888- 3895, 2010.
8. SLAVIN, J. L., LLOYD, B. Health Benefits of Fruits and Vegetables. **Advances in Nutrition**, v. 3, n. 4, p. 506-516, 2012.
9. ROESLER R. et al. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Food Science and Technology**, v. 27, n.1, p. 53-60, 2007.
10. AL-DUAIS, M. et al. Antioxidant capacity and total phenolics of *Cyphotemma digitatum* before and after processing: use of different assays. **European Food Research and Technology**, v. 228, p. 813-821, 2009.
11. FIRUZI, O. et al. 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, n. 1-3, p. 174-184, 2005.
12. LEITE, A. V.; MALTA, L. G.; RICCIO, M. F.; EBERLIN, M. N.; PASTORE, G. M.; MARÓSTICA JÚNIOR, M. R. Antioxidant potential of rat plasma by administration of freeze-dried jaboticaba peel (*Myrciaria jaboticaba* Vell Berg). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 2277-2283, 2011.
13. LAU, B. F.; KONG, K. W.; LEONG, K. H.; SUN, J.; HE, X.; WANG, Z.; MUSTAFA, M. R.; LING, T. C.; ISMAIL, A. Banana inflorescence: Its bio-prospects as an ingredient for functional foods. **Trends in Food and Science Technology**, v. 97, p. 14–28. 2020.
14. SHAHIDI, F.; YEO, J. D.; Insoluble-bound phenolics in food. **Molecules**, v. 21 (9). 2016.
15. RICOCHON, G., MUNIGLIA, L. Influence of enzymes on the oil extraction processes in aqueous media. **Oléagineux, Corps Gras, Lipides**, v. 17, p. 356–359, 2010.