



## TRATAMENTO ENZIMÁTICO COMBINADO COMO ESTRATÉGIA PARA AUMENTAR A EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS ANTIOXIDANTES INSOLÚVEIS EM GRÃOS DE MOSTARDA

Guilherme Pacheco Garcia\*, Gabriela Boscariol Rasera, Ruann Janser Soares de Castro

Universidade de Campinas (Unicamp), Departamento de Ciência de Alimentos (DCA), Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA), Campinas, São Paulo, Brasil.

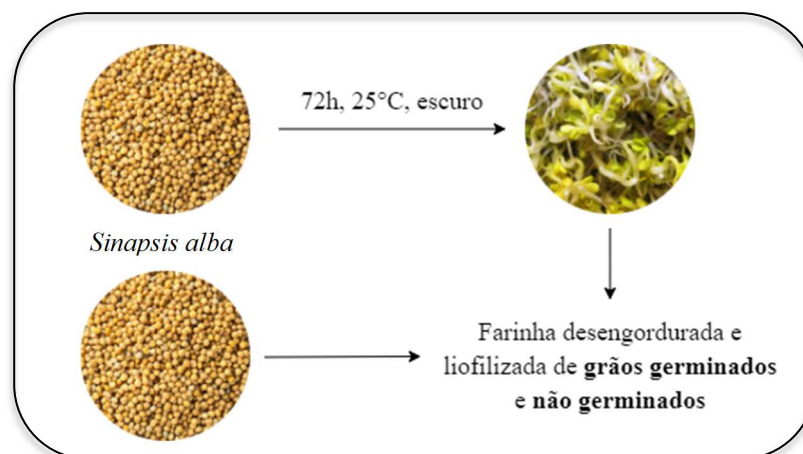
### RESUMO

Os compostos fenólicos com atividade antioxidante presentes na natureza existem nas formas solúveis, insolúveis e esterificadas. Tendo em vista o aproveitamento da fração insolúvel, que está covalentemente ligada à parede celular, a hidrólise enzimática é uma alternativa vantajosa com forte apelo ao desenvolvimento de processos ambientalmente amigáveis e sustentáveis. Com estudos promissores, a germinação de grãos também é encorajada para a potencialização dos compostos bioativos presentes nos mesmos. Neste sentido, o presente projeto teve como objetivo central avaliar os efeitos do tratamento utilizando enzimas com diferentes naturezas catalíticas de forma isolada e/ou combinadas sobre a recuperação de compostos antioxidantes de grãos de mostarda branca (*Sinapsis alba*) germinados e não germinados. Os resultados demonstraram que a combinação ternária das enzimas protease, celulase e pectinase resultou em extratos com aumentos aproximados de 71; 16; 33 e 66% para compostos fenólicos totais, e atividade antioxidante medida pelos métodos ABTS, DPPH e FRAP, respectivamente, em comparação ao controle (não hidrolisado). A germinação, aplicada de maneira isolada, gerou aumento de até 68% na atividade antioxidante mensurada pelo método DPPH, em relação ao ensaio controle. Quando utilizados em associação, a germinação e a hidrólise apresentaram efeito antagônico. Desta forma, os resultados positivos enfatizam a eficiência da germinação e do tratamento enzimático em aumentar o teor de compostos fenólicos com potencial antioxidante, quando aplicados de forma independentes.

**Palavras-chave:** hidrólise enzimática; germinação; grãos de mostarda.

### 2. ESQUEMA SIMPLIFICADO DA METODOLOGIA UTILIZADA

As figuras a seguir apontam as etapas desenvolvidas para a execução do presente projeto.



**Figura 1.** Processo de germinação e preparo da farinha de grãos de mostarda.

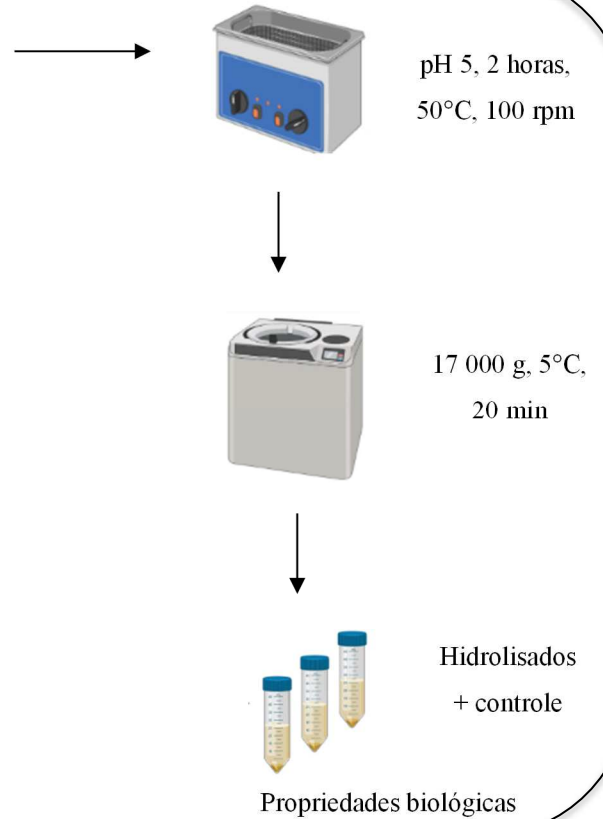
**Tabela 1.** Planejamento Experimental de misturas para definição da composição enzimática mais adequada para recuperação de compostos antioxidantes de mostarda branca.

Ensaio	Protease	Celulase	Pectinase
1	1	0	0
2	0	1	0
3	0	0	1
4	1/2	1/2	0
5	1/2	0	1/2
6	0	1/2	1/2
7	1/3	1/3	1/3
8	2/3	1/6	1/6
9	1/6	2/3	1/6
10	1/6	1/6	2/3

$$Y_i = \sum_{i=1}^q \beta_i X_i + \sum_{i < j}^q \beta_{ij} X_i X_j + \sum_{i < j < k}^q \beta_{ijk} X_i X_j X_k$$

Software Statistica® 13.3 da TIBCO Software Inc.

R<sup>2</sup>; ANOVA.



**Figura 2.** Hidrólise enzimática e obtenção dos extratos de mostarda branca.

### Teor de compostos fenólicos totais (CFT)

(Pereira et al., 2017)

- 25 µL de amostra ou padrão (Ácido gálico)
- 25 µL de Folin-Ciocalteu (50% v:v)
- 200 µL de carbonato de cálcio (5% m:v)

### ABTS (Al-Duais, 2009)

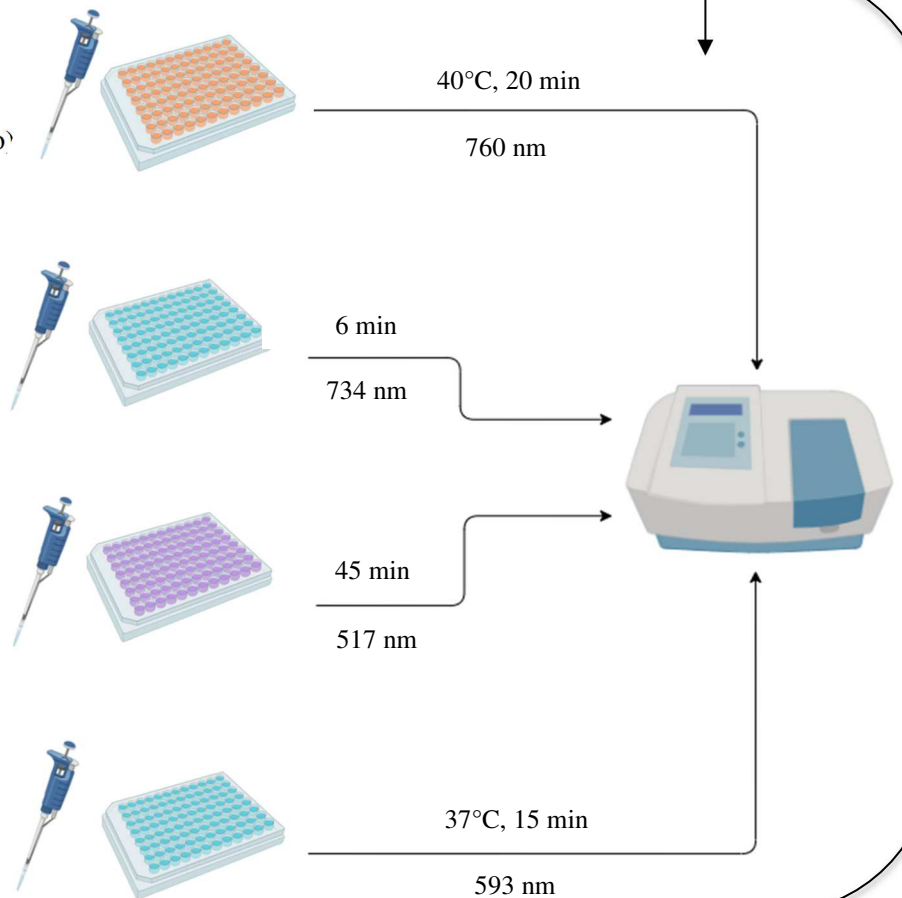
- 20 µL de amostra ou padrão (Trolox)
- 220 µL de solução ABTS

### DPPH (Al-Duais, 2009)

- 66 µL de amostra ou padrão (Trolox)
- 134 µL de solução DPPH (150 µmol/L)

### FRAP (Benzie e Strain, 1996)

- 25 µL de amostra ou padrão (Trolox)
- 175 µL de reagente FRAP



**Figura 3.** Determinação das propriedades biológicas dos extratos de mostarda branca hidrolisados e controle.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir do planejamento experimental de misturas apresentado na **Tabela 1**, avaliou-se o tratamento enzimático mais adequado para recuperação de compostos com atividade antioxidante em grãos de mostarda branca não germinada e germinada. As respostas para inibição dos radicais ABTS e DPPH, atividade antioxidante medida pelo poder de redução do ferro (FRAP) e teor de compostos fenólicos totais (CFT) assim como seus respectivos controles encontram-se compilados na **Tabela 2**. A variação 1 (%) apresentada foi calculada por meio da comparação entre as amostras hidrolisadas (amostras de 1 a 10) e seus respectivos controles (0), considerando a amostra hidrolisada como o valor final e a amostra controle como valor inicial (resultados na mesma coluna). Já a variação 2 (%) foi calculada pela comparação entre as amostras que receberam o mesmo tratamento enzimático ou amostra controle, considerando a amostra germinada como o valor final e a amostra não germinada como valor inicial (resultados na mesma linha) (**Tabela 2**).

A hidrólise enzimática aplicada de maneira isolada – portanto, nos grãos não germinados – resultou em aumentos de até 70% (CFT, ensaio 8 em comparação ao controle, variação 1). A hidrólise utilizando três enzimas distintas aumenta as possibilidades de quebra eficiente dos tecidos vegetais, uma vez que a parede celular de grãos possui composição complexa de carboidratos (celulose, hemicelulose, lignina e pectina) além de proteínas, o que justifica o efeito sinérgico entre as enzimas protease, celulase e pectinase, observado em nosso estudo.

A germinação, por sua vez, gerou aumentos de até 68% na atividade antioxidante mensurada pelo método DPPH, em relação ao ensaio controle (**Tabela 2**). Os efeitos positivos da germinação estão associados à ativação de enzimas hidrolíticas presentes nos grãos pela entrada de água durante a embebição, que desencadeiam diversas reações de hidrólise, liberando os compostos fenólicos insolúveis ligados à parede celular (Rasera, Hilckner e de Castro, 2020). Além disso, durante o crescimento do broto, novos compostos fenólicos são produzidos por síntese *de novo* a partir de glicose, resultando em um conseqüente aumento de compostos fenólicos com atividade antioxidante, como observado nos resultados deste trabalho (Rasera e de Castro, 2020).

No entanto, a aplicação da hidrólise nos grãos germinados, com o propósito de maior liberação dos compostos insolúveis ligados à parede celular, apresentou efeitos antagonísticos (**Tabela 2**). Assim, foi possível inferir que ambos os processos desempenharam funções semelhantes nos grãos, e, portanto, quando aplicados isolados, são positivos e suficientes para obtenção do resultado esperado: aumento do potencial antioxidante da fração solúvel.

O coeficiente de correlação múltipla ( $R^2$ ) e a relação entre o valor F calculado e o seu valor tabelado foram utilizados para verificar a qualidade do ajuste realizado frente aos valores reais que compõem o planejamento experimental. Os resultados para CFT, assim como capacidade antioxidante medida pelos métodos ABTS, DPPH e FRAP para a mostarda branca não germinada apontaram coeficientes de correlação múltipla ( $R^2$ ) muito baixos, valores de F calculado menores do que os valores tabelados, além de ausência de significância estatística das regressões ( $p > 0,10$ ). Nestes casos, não foram gerados modelos matemáticos capazes de prever as respostas dentro das condições de processo utilizadas. Uma das explicações para tal resultado é a similaridade entre as respostas para as diferentes condições de hidrólise, em que apenas alguns ensaios se sobressaíram (ensaio 8, por exemplo) (**Tabela 2**).

Para a mostarda germinada, as regressões foram consideradas significativas ( $p \leq 0,10$ ) e os modelos adequados para explicar a variação dos resultados tendo em vista que a ANOVA forneceu valores de  $R^2$  variando de 0,75 a 0,94, indicando que o ajuste utilizado é capaz de explicar cerca de 75 a 94% da variação dos resultados obtidos para CFT, ABTS e FRAP. Os parâmetros calculados para a resposta DPPH não demonstraram significância estatística e, portanto, o modelo não foi gerado.

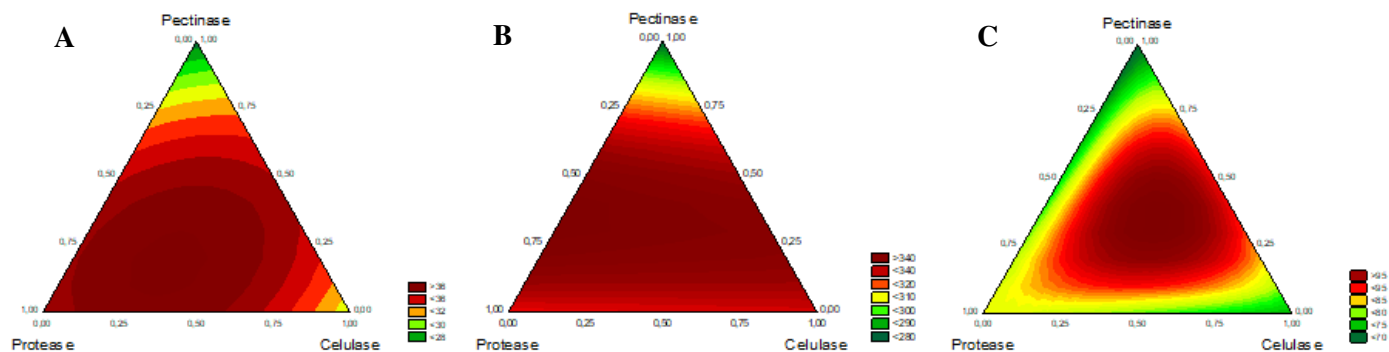
A partir das variáveis independentes e respostas obtidas, as curvas de contorno foram geradas (**Figura 4**). De maneira geral, é possível observar que os resultados mais expressivos em todas as curvas se concentram nos ensaios onde as combinações ternárias de enzimas foram aplicadas, indicando um importante efeito sinérgico entre as mesmas.

Diante deste contexto, o ensaio 8 foi a condição selecionada como mais adequada para a hidrólise enzimática tanto para a mostarda não germinada como para a germinada, uma vez que a escolha das mesmas combinações de enzimas para ambos os tipos de mostarda possibilitariam a comparação entre a hidrólise feita em grãos não germinados e germinados (**Tabela 2**). A validação experimental do ensaio 8 foi realizada e os valores experimentais não diferiram estatisticamente ( $p \leq 0,05$ ) dos valores previstos pelos modelos gerados.

**Tabela 1** - Respostas para Compostos Fenólicos Totais (CFT), inibição do radical ABTS e DPPH e FRAP obtidas a partir do planejamento experimental de misturas.

<i>CFT (mgAGE g<sup>-1</sup>)</i>					
Ensaio	Amostras não germinadas	Varição 1 (%) <sup>1</sup>	Amostras germinadas	Varição 1 (%)	Varição 2 (%)
Controle	20,94 ± 0,65	0,00	34,13 ± 0,12	0,00	62,98
1	22,67 ± 0,59	8,27	33,8 ± 1,38	-0,96	49,09
2	25,95 ± 1,97	23,91	30,23 ± 2,62	-11,43	16,49
3	25,04 ± 0,18	19,59	26,9 ± 1,57	-21,19	7,40
4	24,75 ± 0,96	18,19	35,25 ± 1,02	3,26	42,40
5	28,12 ± 2,97	34,26	33,96 ± 3,17	-0,51	20,77
6	24,27 ± 2,29	15,90	34,67 ± 0,99	1,57	42,84
7	27,09 ± 0,10	29,34	36,52 ± 2,13	7,01	34,84
8	35,76 ± 0,33	70,76	36,72 ± 2,50	7,58	2,68
9	27,55 ± 2,00	31,54	34,05 ± 3,92	-0,23	23,62
10	28,11 ± 1,34	34,22	31,18 ± 1,85	-8,66	10,92
<i>ABTS (μmol TE g<sup>-1</sup>)</i>					
Ensaio	Amostras não germinadas	Varição 1 (%) <sup>1</sup>	Amostras germinadas	Varição 1 (%)	Varição 2 (%)
Controle	205,5 ± 5,26	0,00	326,17 ± 6,21	0,00	58,72
1	204,52 ± 0,69	-0,50	314,74 ± 3,49	-3,50	53,89
2	213,62 ± 3,19	4,00	317,06 ± 3,22	-2,79	48,43
3	227,93 ± 2,48	10,90	283,13 ± 10,10	-13,20	24,22
4	208,68 ± 1,77	1,50	326,8 ± 2,03	0,19	56,60
5	212,75 ± 2,34	3,50	329,16 ± 4,06	0,92	54,71
6	218,59 ± 1,22	6,40	324,03 ± 11,19	-0,66	48,23
7	218,05 ± 3,45	6,10	346,71 ± 5,95	6,30	59,00
8	239,09 ± 1,87	16,30	353,37 ± 4,00	8,34	47,80
9	210,02 ± 1,97	2,20	352,49 ± 6,34	8,07	67,84
10	214,27 ± 1,35	4,30	325,08 ± 1,46	-0,33	51,72
<i>DPPH (μmol TE g<sup>-1</sup>)</i>					
Ensaio	Amostras não germinadas	Varição 1 (%) <sup>1</sup>	Amostras germinadas	Varição 1 (%)	Varição 2 (%)
Controle	34,77 ± 0,63	0,00	58,46 ± 4,37	0,00	68,14
1	34,52 ± 1,41	-0,71	49,91 ± 3,46	-14,63	44,57
2	38,47 ± 0,21	10,66	51,64 ± 2,12	-11,67	34,22
3	42,32 ± 0,48	21,71	50,47 ± 1,78	-13,68	19,25
4	36,53 ± 1,03	5,07	55,76 ± 2,78	-4,62	52,63
5	38,13 ± 0,56	9,68	52,6 ± 3,81	-10,02	37,94
6	38,3 ± 0,48	10,16	60,09 ± 0,36	2,79	56,89
7	38,25 ± 1,26	10,02	60,98 ± 0,81	4,30	59,40
8	46,22 ± 3,73	32,93	57,7 ± 1,08	-1,29	24,83
9	38,37 ± 0,34	10,36	57,11 ± 1,41	-2,32	48,83
10	40,47 ± 1,62	16,40	51,68 ± 0,42	-11,59	27,71
<i>FRAP (μmol TE g<sup>-1</sup>)</i>					
Ensaio	Amostras não germinadas	Varição 1 (%) <sup>1</sup>	Amostras germinadas	Varição 1 (%)	Varição 2 (%)
Controle	59,81 ± 3,28	0,00	90,16 ± 1,94	0,00	50,73
1	61,7 ± 1,01	3,15	81,31 ± 4,58	-9,81	31,78
2	72,1 ± 3,27	20,55	74,2 ± 7,68	-17,69	2,91
3	76,11 ± 4,37	27,25	64,71 ± 1,94	-28,22	-14,97
4	67,55 ± 5,99	12,93	74,13 ± 4,63	-17,78	9,75
5	74,8 ± 0,59	25,05	83,95 ± 8,27	-6,89	12,23
6	72,67 ± 6,07	21,50	88,86 ± 5,85	-1,44	22,28
7	74,53 ± 0,74	24,61	95,92 ± 1,93	6,39	28,70
8	99,43 ± 8,46	66,24	89,21 ± 3,85	-1,05	-10,28
9	75,8 ± 2,15	26,73	95,81 ± 4,18	6,27	26,39
10	85,5 ± 7,81	42,94	89,23 ± 8,77	-1,03	4,37

A unidade μmol TE g<sup>-1</sup> corresponde a μmol de Trolox Equivalentes por grama de amostra, enquanto a sigla mg AGE g<sup>-1</sup> corresponde a miligramas de ácido gálico equivalentes por grama de amostra.<sup>1</sup>



**Figura 4** - Curvas de contorno para CFT (A) e atividade antioxidante avaliada pelos métodos ABTS (B) e FRAP (C), para hidrolisados de mostarda branca germinada.

#### 4. CONCLUSÕES

Como resultado do planejamento experimental de misturas, a combinação ternária de enzimas (2/3 de Protease, 1/6 de Celulase e 1/6 de Pectinase), com concentração final de 1% (m/v), foi definida como a mais adequada, dentre as avaliadas, para hidrólise enzimática de grãos de mostarda branca não germinados, resultando em aumento da extração de compostos fenólicos com atividade antioxidante. Apesar da associação de hidrólise e germinação ter apresentado efeitos antagônicos, quando aplicados de forma isolada apresentaram efeitos interessantes, sendo, portanto, excelentes opções para um maior aproveitamento do potencial biológico dos grãos de mostarda.

#### 5. AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pelo auxílio financeiro e concessão da bolsa de Iniciação Científica dentro do Programa PIBIC -Unicamp. A todos os integrantes do Laboratório de Bioquímica de Alimentos pela atenção, suporte e acolhimento, em especial à Doutoranda Gabriela Boscarior Raser e ao Professor Doutor Ruann Janser Soares de Castro.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-DUAIS, Mohammed et al. Antioxidant capacity and total phenolics of *Cyphostemma digitatum* before and after processing: use of different assays. **European Food Research and Technology**, v. 228, n. 5, p. 813-821, 2009.
- BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70–76, 1996.
- 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, n. 1, p. 125, 2017.
- RASERA, G.B. et al. Biologically active compounds from white and black mustard grains: An optimization study for recovery and identification of phenolic antioxidants. **Industrial Crops and Products**, v. 135, p. 294–300, 2019.
- RASERA, G. B.; HILKNER, M. H.; DE CASTRO, R. J. S. Free and insoluble-bound phenolics: How does the variation of these compounds affect the antioxidant properties of mustard grains during germination? **Food Research International**, v. 133, p. 109115, 2020.
- RASERA, G. B.; DE CASTRO, R. J. S. Germinação de grãos: uma revisão sistemática de como os processos bioquímicos envolvidos afetam o conteúdo e o perfil de compostos fenólicos e suas propriedades antioxidantes. **Brazilian Journal of Natural Sciences**, v. 3, n. 1, p. 287, 2020.